UNTERSUCHUNGEN ZUM STOFFWECHSEL DER 3-(1-PHENYLPROPYL)-5-PHENYLTETRON-SÄURE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

JÜRGEN SCHINKE
aus Berlin

BERLIN 1976

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0080

UNTERSUCHUNGEN ZUM STOFFWECHSEL DER 3-(1-PHENYLPROPYL)-5-PHENYLTETRONSÄURE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

JÜRGEN SCHINKE
aus Berlin

BERLIN 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Rehse

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 1977

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Rehse durchgeführt.

Für seine Unterstützung und fördernden Hinweise danke ich ihm sehr herzlich.

Der tierexperimentelle Teil der Arbeit wurde am Institut für Embryonal-Pharmakologie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Dr. G. Bochert durchgeführt. Für seine Einweisung in die Arbeitsmethodik und für seine stete Hilfsbereitschaft danke ich ihm ebenfalls sehr herzlich.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung und Problemstellung 1

1.1. Wirkungsweise der Antikoagulantien 1

1.1.1. Direkte Antikoagulantien 2

1.1.2. Indirekte orale Antikoagulantien 2

1.2. PPTS, eine neue Substanz mit blutgerinnungshemmenden Eigenschaften 4

1.3. Problemstellung 5

2. Pharmakologischer Teil 6

2.1. Vorbemerkungen 6

2.2. Wirkung der PPTS 6

2.2.1. Wirkungsmechanismus 7

2.3. Pharmakodynamik 7

2.4. Pharmakokinetik 10

2.4.1. Resorption 10

2.4.2. Eiweißbindung 11

2.4.3. Verteilung 12

2.4.4. Elimination (Renale Exkretion/Biliäre Exkretion) 13

2.5. Pharmakokinetik der PPTS 15

2.5.1. Bestimmung der Konz.-Änderung der PPTS in den Geweben 16

2.5.1.1. Konz.-Änderung im Blut 17

2.5.1.1.1. Beschreibung der PPTS-Blutspiegelkurve 19

2.5.1.1.2. Pharmakologische Auswertung 20

Seite

2.5.1.2. Konz.-Änderung in der Leber 22

2.5.1.2.1. Beschreibung des Kurvenverlaufs der PPTS-Konzentration in der Leber 24

2.5.1.2.2. Pharmakologische Auswertung 24

2.5.1.3. PPTS-Konzentrations-Änderung in Harn u. Faeces 25

2.5.1.3.1. Beschreibung des Kurvenverlaufs der im Harn gemessenen PPTS-Konzentration 27

2.5.1.3.2. Pharmakologische Auswertung 28

2.5.1.4. PPTS-Konzentration in den Faeces 31

2.5.2. Konzentrationsänderung und Wirkung 32

2.5.3. Vorkommen der PPTS in anderen Geweben 35

2.5.4. Diskussion der Ergebnisse 36

.6.Biotransformation 39

2.6.1. Biotransformation von Antikoagulantien 40

2.6.1.1. Für die Biotransformation von Antikoagulantien wichtige enzymatische Reaktionen 40

2.6.1.2. Metabolismus des Cumaringerüstes 40

2.6.1.3. Metabolismus einiger in der Praxis angewandter Antikoagulantien vom Cumarin-Typ 41

2.6.2. Biotransformation von PPTS 42

2.6.2.1. Ausscheidung im Harn 43

2.6.2.2. Freie PPTS und hydroxylierter Metabolit 44

2.6.2.3. Massenspektrometrischer Abbau der PPTS und des hydroxylierten Metaboliten 45

2.6.2.4. Benzoesäure und Phenylessigsäure 46

2.6.2.5. Herkunft der beiden aromatischen Carbonsäuren 48

Seite

2.5.2.6. Fragmentierungsschemata 55

2.6.2.7. Metaboliten, die als Konjugate ausgeschieden werden. 59

2.6.2.8. Zusammenstellung der im Harn identifizierten PPTS-Ausscheidungsformen 60

2.6.3. Ausscheidung mit den Faeces 60

2.6.4. Diskussion der Ergebnisse 61

2.7. Zusammenfassung 64

3. Experimenteller Teil 66

3.1. Quantifizierung 66

3.1.1. Versuchstiere 66

3.1.1.1. Applikationsform 66

3.1.1.2. Applikationsart 66

3.1.2. Herstellung der Organextrakte 67

3.1.2.1. Blut 67

3.1.2.2. Leber 67

3.1.2.3. Embryo 67

3.1.3. Gaschromatografie 68

3.1.3.1. Vorbereitung der Proben 70

3.1.3.2. Berechnung der in den Proben enthaltenen PPTS-Mengen 71

3.1.3.3. Gaschromatogramme 74

3.2. Isolierung und Strukturaufklärung der Metaboliten 75

3.2.1. Allgemeine Methodik 75

3.2.2. Extraktion von Urin und Faeces 77

Seite

3.2.2.1. Schema der Harnextraktion mit Amberlite XAD - 2 79

3.2.2.2. Enzymatische Spaltung von Konjugaten 80

3.2.2.3. Herstellung von Faecesextrakt 81

3.2.3. Trennung des Substanzgemisches 82

3.2.3.1. Präparative Dünnschicht 82

3.2.3.2. Transfertechnik 85

3.2.4. Strukturaufklärung durch MS. 86

4. Literaturverzeichnis 87

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Wirkungsweise der Antikoagulantien

Ein charakteristisches Symptom des bei der Thrombose manifesten Krankheitsbildes ist die Hyperkoagulabilität des Blutes.

Therapie und Prophylaxe zielen daher auf die Senkung der in einem kausalen Zusammenhang mit der Thrombusentstehung befindlichen verstärkten Gerinnungsbereitschaft.

Der gewünschte Effekt läßt sich durch Einsatz von Antikoagulantien erreichen.

Der Begriff Antikoagulantien umfaßt dabei im Hinblick auf Wirkungsweise und chemische Struktur recht unterschiedliche Substanzen. Gemeinsam ist ihnen dieselbe Wirkung: Sie verlängern die Gerinnungszeit des Blutes.

Das kann durch Fällung der essentiellen Calziumionen oder anderer gerinnungsaktiven Substanzen geschehen, aber auch durch Einfluß von Antithrombin und Antithromboplastin sowie Hemmung der Bildung gerinnungsaktiver Substanzen im Körper.

Therapeutische Bedeutung besitzen allerdings nur Substanzen mit Antithrombin- und Antithromboplastinwirkung und diejenigen, von denen die Synthese der für die Gerinnung notwendigen Faktoren gehemmt wird.

1.1.1. Direkte Antikoagulantien

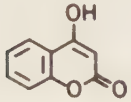
Nach der Art ihres Eingreifens in den Mechanismus der Blutgerinnung lassen sich die in der Praxis angewandten Pharmaka weiter charakterisieren:
Direkte Antikoagulantien hemmen die Aktivität des Thromboplastins und verhindern damit die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin. Ferner wird die Aktivität vorhandenen Thrombins unterdrückt. Die Wirkung tritt rasch ein, ist aber von kurzer Dauer. Sie läßt sich in vitro und in vivo erreichen.

Heparin, ein im Körper vorhandener Mucoitinpolyschwefelsäureester wirkt in dieser Weise.
Dem therapeutischen Einsatz von Heparin sind Grenzen gesetzt. Es wird enteral nicht resorbiert und muß aus diesem Grund parenteral appliziert werden.

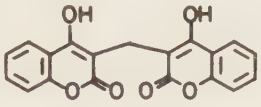
1.1.2. Indirekte orale Antikoagulantien

Indirekte Antikoagulantien hemmen dagegen die Synthese der Faktoren II; IX; X in der Leber.
Sie sind Antagonisten des Vitamin K. Ihre Wirkung setzt erst nach einer Latenzzeit ein.
Der verzögerte Wirkungsbeginn wird dahingehend interpretiert, daß erst die vorhandenen körpereigenen Faktoren abgebaut sein müssen um die Gerinnungsfähigkeit des Blutes herabzusetzen.
In vitro wird die Koagulabilität nicht beeinflußt.

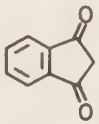
4-Hydroxy-Cumarin-, Dicumarol- und 1,3-Indandionabkömmlinge vertreten diese Gruppe.



4-HYDROXYCUMARIN



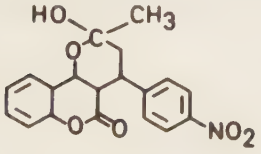
DICUMAROL



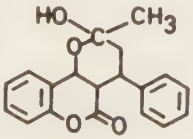
1,3 INDANDION

Ihr Vorteil besteht in der Möglichkeit oraler Applikation und verlängerter Wirkungsdauer. Eingang in die Praxis fanden vor allem Cumarinderivate aufgrund ihrer im Verhältnis zu den Indandionen geringeren Toxizität.

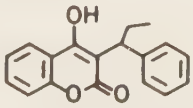
Eintritt und Dauer der Wirkung oraler Antikoagulantien variieren stark. Während Kurzzeitantikoagulantien nach etwa 24 Std. maximale Wirkung entfalten und die Gerinnungszeit bis zu 3 Tagen herabsetzen, hemmen Langzeitantikoagulantien die Blutgerinnung bis zu zehn Tagen und erreichen das Maximum der Wirkung 2 bis 3 Tage nach Applikation. Dazwischen sind Obergänge vorhanden.



SINTROM



WARFARIN



MARCUMAR

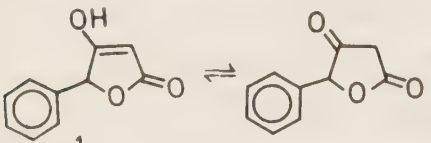
Obwohl einiges über Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus der Antikoagulantien bekannt ist und viele Untersuchungen durchgeführt wurden, sind die Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung der oralen Antikoagulantien bisher weniger bearbeitet worden.

LINK und Mitarbeiter [1] sowie RENK und STOLL [2] entwickelten Vorstellungen über die chemischen Eigenschaften eines Pharmakon

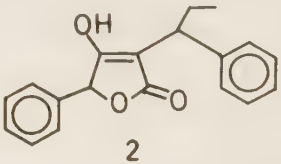
mit gerinnungshemmender Aktivität: Sie postulierten ein benzokondensiertes Ringsystem vom Typ des 4-Hydroxycumarin mit einem Substituenten in C - 3 Stellung.
REHSE und WAGENKNECHT [3] konnten jedoch zeigen, daß diese Forderung nicht eingehalten werden muß.

1.2. PPTS, eine neue Substanz mit blutgerinnungshemmenden Eigenschaften

Sie synthetisierten eine Substanz, die kein annelliertes Ringsystem aufweist und trotzdem die Gerinnungsfähigkeit des Blutes senkt. Diese neue Substanz (**2**) leitet sich von der in 5-Stellung phenylsubstituierten Tetronsäure (**1**) ab, die in 2 tautomeren Formen vorliegen kann.



1



2

Sie trägt in 3-Stellung einen Phenylpropylrest.
Die strukturelle Ähnlichkeit zum Marcumar ist evident. Sein 4-Hydroxycumaringerüst ist in gleicher Weise substituiert.

Trotz der ähnlichen Struktur zeigen sich im pharmakologischen Verhalten große Unterschiede.
Ist Marcumar der Prototyp eines Langzeitantikoagulans mit langsam einsetzender, lange anhaltender Wirkung, so erreicht die Aktivität der 3-(1-Phenylpropyl)-5-phenyltetronsäure, im folgenden PPTS abgekürzt, bereits nach zehn Stunden ein Maximum und sinkt dann wieder ab.

1.3. Problemstellung

Es war daher zu prüfen, ob die neue Substanz wie ein direktes Antikoagulans in den Mechanismus der Blutgerinnung eingreift. Zu diesem Zweck war die zeitliche Korrelation zwischen Wirkung und Konzentration in Blut und Organen festzulegen.
Ferner war von Interesse, den Einfluß der Biotransformation auf das Abklingen der Wirkung zu untersuchen.
Sollte sich eine Phasenverschiebung zwischen maximalen Blutwerten und Wirkung ergeben, wie das bei Antikoagulantien nicht unüblich ist, so wäre die Prüfung wichtig, ob dies auf die Bildung eines aktiven Metaboliten zurückzuführen ist.
Auch aus dieser Fragestellung wäre die Notwendigkeit der Strukturaufklärung der Metaboliten abzuleiten.

Zur Beantwortung der vorstehenden Fragen will die vorliegende Arbeit mit tierexperimentell gewonnenen Ergebnissen beitragen.

2. Pharmakologischer Teil

2.1. Vorbemerkungen

Zu Beginn ist es erforderlich, auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften der PPTS einzugehen, die das pharmakologische Verhalten der Substanz beeinflussen können.

Die PPTS ist das 3,5-disubstituierte Gammalacton der β, γ-Dihydroxycrotonsäure bzw. der tautomeren γ-Hydroxyacetessigsäure. Sie und ihre Derivate unterscheiden sich von anderen Lactonen durch ihre große Stabilität gegen die Einwirkung von Basen oder Säuren.
Die Substanz besteht aus farblosen Kristallnadeln, die in Wasser unlöslich, schwer löslich in Äther, dagegen gut löslich in Methanol, Äthanol und Aceton sind.
Das Molekulargewicht der PPTS beträgt 294.

2.2. Wirkung der PPTS

Die durch PPTS bewirkte Veränderung biologischer Funktionen zeigt sich in der Herabsetzung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes. Sie ist die Hauptwirkung der PPTS und wurde bei anderen in der Natur vorkommenden oder synthetisch hergestellten Tetronsäurederivaten nicht gefunden.
Sekundär macht sich im Tierversuch bei den mit PPTS be-

handelten Tieren Apathie und Schlaffheit durch erniedrigten Muskel-Tonus bemerkbar.
Das steht in Einklang mit Befunden von anderen Tetronsäurederivaten, die eine sedierende Wirkung zeigten. Die Wirkung selbst ist auf das flüssige Organ Blut beschränkt und setzt erst nach einer Latenzzeit ein.

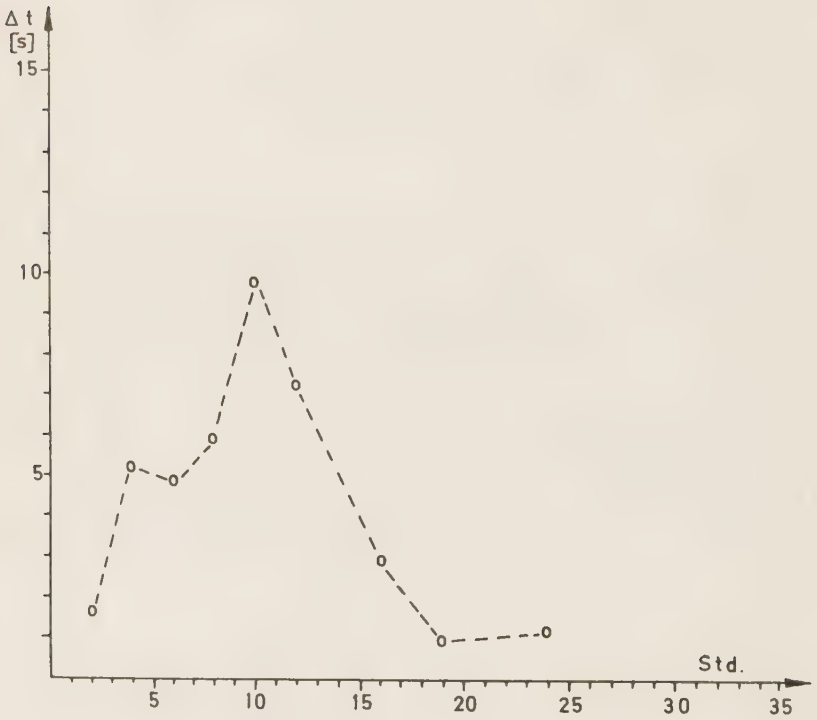
2.2.1. Wirkungsmechanismus

Eine mögliche Art der Hemmung eines Reaktionsablaufes ist die kompetitive Hemmung. Nach MARTIUS [4] verdrängen Indandione und Cumarine Vitamin K aus einem Fermentsystem und entkoppeln dadurch die oxydative Phosphorylierung.
Die Proteinsynthese wird gestört, die Bildung gerinnungsfördernder Faktoren verhindert.
Nach OLSEN [5] greifen die oralen Antikoagulantien in den genetischen Entstehungsprozeß der Gerinnungsfaktoren ein und wirken so als Vitamin-K-Antagonisten.
Die strukturelle Verwandtschaft der PPTS zu den Cumarinderivaten läßt auf eine ähnliche Wirkungsweise schließen.
Zellstrukturen mit für Antikoagulantien spezifischen Rezeptoreigenschaften sind jedoch noch nicht gefunden worden.

2.3. Pharmakodynamik

Stärke und Dauer der Wirkung einer Einzeldosis lassen sich graphisch darstellen, wenn der entsprechende Wirkungsparameter in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen wird.

Abb. 1:



Quickwerte nach oraler Applikation von 50 mg Substanz/Tier nach WAGENKNECHT.

WAGENKNECHT bestimmte als Maß für die herabgesetzte Gerinnungsfähigkeit des Blutes den Quickwert. (Abb. 1)

Nach oraler Applikation von 50 mg Substanz/Tier wurde in Zeitabständen von 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19 und 24 Stunden der Quickwert bei den aus jeweils drei Ratten bestehenden Tierkollektiven gemessen und in einer Kurve graphisch dargestellt.

Sie sagt aus, daß schon nach zwei Stunden am Wirkort eine Substanzkonzentration vorhanden ist, die ausreicht, um eine meßbare Wirkung zu erzeugen.
Die Aktivität der Substanz steigt steil an, sinkt nach vier Stunden etwas ab und erreicht nach zehn Stunden ein Maximum.

Innerhalb der nächsten zehn Stunden klingt die Wirkung ab, so daß nach insgesamt zwanzig Stunden die Quickwerte sich nicht mehr signifikant von den Ausgangswerten unterscheiden. Die Kurve stellt damit ein Profil des Wirkungsverlaufes über einen

Zeitraum von 24 Stunden dar.
Die Größe der Wirkung, als Summe von Wirkungsdauer und Wirkungsstärke, ist abhängig von der Höhe der Dosis des verabreichten Pharmakon und der Ansprechbarkeit der Rezeptoren. Diese Abhängigkeit kann linear sein. Für PPTS ist das, wie bei vielen Pharmaka, nicht der Fall.
Bei einer Verdoppelung der Dosis z.B. wird die Wirkung nicht verdoppelt.
Aussagen dieser Art sind rein qualitativer Natur. Es ist nichts über die Verteilung und Konzentration der Substanz in den verschiedenen Organen und ihr Verhältnis zur Wirkung gesagt.

2.4. Pharmakokinetik

Parameter der Pharmakokinetik sind Resorption, Verteilung und Elimination.
Die Quantifizierung der Konzentrationsänderungen im Blut erlaubt Aussagen über diese Funktionsabläufe in Abhängigkeit von der Zeit und ihre Korrelation zur Wirkung.

2.4.1. Resorption

Im Gastrointestinaltrakt befindliche Stoffe können nach unterschiedlichen Mechanismen resorbiert werden.
Für Pharmaka hat die nichtionische Diffusion die größte Bedeutung.
Hierbei penetrieren lipophile Moleküle die nichtpolaren Bereiche

der Membran in undissoziierter Form entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten.
Für diesen Weg ist die PPTS durch ihre lipophilen Eigenschaften und ihr Molekulargewicht besonders geeignet.
Im Gegensatz zu dieser passiven Diffusion besteht für höher molekulare Substanzen die Möglichkeit, durch partikuläre Resorption in die Blutbahn zu gelangen. Hierbei schnürt sich eine Ausbuchtung der Zellwand ab und transportiert die Substanz durch die Zelle.
Auf diese Weise wird Heparin durch die Zelle geschleust.
Die PPTS kann also nach einem ganz anderen Mechanismus resorbiert werden als das Heparin.

Von großer Bedeutung ist der am Ort der Resorption herrschende pH-Wert, weil nur der nichtionisierte Anteil des Pharmakon die Lipidschranke passieren kann.
Obwohl der im Magen vorhandene stark saure pH-Wert eine Resorption der dann undissoziiert vorliegenden PPTS hier begünstigen würde, ist der Ort der eigentlichen Resorption im alkalischen Dünndarm zu suchen.
Um jeden Einfluß der Magenfüllung auf die Resorption auszuschalten, wurden die Ratten zur Zeit der Versuche nüchtern gehalten.

2.4.2. Eiweißbindung

Im Blut können Pharmaka in freier Form und an Einweiß gebunden vorliegen.

Die Bindung an Plasmaeiweiß ist unspezifisch.
Der freie Anteil steht im reversiblen Gleichgewicht mit dem gebundenen Anteil.
Für die Wirkung eines Pharmakon ergeben sich daraus folgende Konsequenzen: Der gebundene Anteil der Substanz kann den Wirkort nicht erreichen, weil er die zellulären Membranen nicht passieren kann und ist deshalb unwirksam.
Andererseits kann der gebundene Anteil nicht durch Biotransformation in seiner Wirkung beeinflußt werden.
Er unterliegt auch nicht der glomerulären Filtration. Der an Eiweiß gebundene Anteil eines Pharmakon wirkt als Depot, aus dem nach Elimination der Substanz aus dem Körper freie Substanz nachgeliefert wird.
Für einige Antikoagulantien ist die Eiweißbindung bestimmt worden.
Für das Langzeitantikoagulans Marcumar beträgt die Proteinbindung 99% [7], für Dicumarol 99% [8] und für Warfarin 97% [9].
Wie sich schon aus der Zeit/Wirkungskurve abschätzen läßt, ist die Proteinbindung für PPTS wahrscheinlich nicht sehr stark, sonst würde die Wirkung nicht so schnell eintreten und auch nicht wieder so rasch abklingen.

2.4.3. Verteilung

Die in mehreren Phasen vonstatten gehende Verteilung kann zur Speicherung der Substanz in dafür geeigneten Geweben führen.

Für die lipophile PPTS käme z.B. das Fettgewebe in Betracht. Als Folge der Speicherung kann sich die Wirkungsdauer verlängern, die aktuelle Konzentration freier Substanz im Plasma wird aber herabgesetzt.

2.4.4. Elimination

Renale Exkretion

Lipoidlösliche Stoffe wie die PPTS können entsprechend ihrem Konzentrationsgefälle wieder aus den Tubuli in die Blutbahn diffundieren. Es erfolgt eine Rückresorption, welche die Konzentration in Harn und Plasma konstant hält. Diese Möglichkeit ist auch für die PPTS in Betracht zu ziehen.
In Analogie zu den Cumarinderivaten ist eine aktive tubuläre Sekretion nicht zu erwarten [10].

Biliäre Exkretion

Die Ausscheidung mit der Galle ist abhängig von der Molekülgröße, der Polarität und der chemischen Struktur des Pharmakon. Ratten scheiden z.B. organische anionische Verbindungen unterhalb eines Molekulargewichtes von etwa 325 nicht mehr mit der Galle aus.
Ferner muß eine polare Gruppe vorhanden sein, die anionisch oder kationisch sein kann.
Die Biotransformation spielt hierbei eine wichtige Rolle. Durch Glukuronidierung wird eine anionische Gruppe eingeführt unt zugleich das Molekulargewicht um 177 Einheiten erhöht.

Die biliäre Ausscheidung wird dadurch wesentlich verbessert.

Rückresorption findet wegen der erhöhten Wasserlöslichkeit der Substanz praktisch nicht mehr statt.
Die mit der Galle in das Darmlumen gelangten mit Glukuronsäure oder Schwefelsäure gepaarten Stoffe können durch bakterielle Einwirkung wieder hydrolytisch gespalten werden. Durch erneute Resorption gelangen sie wieder in die Blutbahn und in die Leber. Sie nehmen damit teil am enterohepatischen Kreislauf. Die Wirkungsdauer des Pharmakon wird durch die im enterohepatischen Kreislauf befindliche Substanzmenge verlängert.

Stoffe mit einem Molekulargewicht unter 300 werden bevorzugt renal, Stoffe mit einem Molekulargewicht über 400 biliär ausgeschieden.
PPTS würde demnach überwiegend renal ausgeschieden, nach Glukuronidierung wäre aber auch Ausscheidung durch die Galle möglich.

2.5. Pharmakokinetik der PPTS

Ihre Beziehung zu Resorption und Elimination, die Korrelation von Konzentrationsänderungen und Wirkung sowie weiterer Verbleib der Substanz im Organismus.

Nach der Gegenüberstellung allgemeiner pharmakologischer Gesetzmässigkeiten mit den physikalischen und chemischen Eigenschaften der PPTS und der sich hieraus ergebenden Einschätzung ihres pharmakologischen Verhaltens folgt die Auswertung der in verschiedenen Organen gemessenen Konzentrationsänderungen der Substanz in Bezug auf ihre Resorption und Elimination, die Korrelation von Konzentrationsänderungen und Wirkung sowie ihren Verbleib im Organismus.
Auf die Biotransformation und die Struktur der Metaboliten wird in einem gesonderten Kapitel eingegangen.
Große Bedeutung besitzen die in Abhängigkeit von der Zeit im Blut gemessenen Substanzkonzentrationen. Ihre in Form einer Kurve graphisch dargestellten Werte erlauben Rückschlüsse auf die Kinetik der Substanz und die Korrelation von Konzentrationsänderung und Wirkung.
Unter der Voraussetzung, daß die Substanzkonzentrationen am Wirkort und im Blut in konstantem Verhältnis zueinander stehen, spiegeln die im Blut gemessenen Werte die Änderung der Substanzkonzentrationen am Wirkort wider.
Diese Bedingung wird erfüllt, wenn das Pharmakon ungehindert in den Verteilungsraum des Wirkortes diffundieren kann.

Die in Leber und Harn enthaltenen PPTS-Konzentrationen wurden ebenfalls quantifiziert um ergänzende Informationen zur Kinetik der Substanz zu erhalten.
Zur Klärung des weiteren Verbleibs der Substanz im Organismus wurde der PPTS-Gehalt von Milz, Niere, Fettgewebe und fetalem Gewebe geprüft.

2.5.1. Bestimmung der Konzentrationsänderungen der PPTS in den Geweben

Die Quantifizierung der PPTS erfolgte gaschromatografisch. **)
Die Gaschromatografie bot sich als Methode der Wahl an.
Ihre Nachweisempfindlichkeit genügte den gestellten Anforderungen völlig, die Ergebnisse ließen sich gut reproduzieren.
In Anlehnung an die Versuche von REHSE und WAGENKNECHT bestand das Tiermaterial aus männlichen, zwischen 160 g und 180 g schweren Sprague-Dawley Ratten. Da die Arbeitshypothese von der PPTS als einem oral wirkenden Antikoagulans ausging, wurde die Substanz auch oral appliziert. Den Tieren eines Kollektivs wurde mit Hilfe einer Schlundsonde jeweils 50 mg Substanz entsprechend etwa 278 mg/kg Tier in Suspensionsform verabreicht. Ein Kollektiv bestand aus zwei Tieren, die im Zeitraum von 1/2 h, 1h, 2 1/2 h, 4 h, 8 h, 10 h, 12 h, 15 h, 19 h, 24 h und 32 h nach Applikation dekapitiert wurden. Organextrakte wurden aus Blut, Leber, Niere, Milz, Fettgewebe und fetalem Gewebe hergestellt. Nähere Angaben finden sich im experimentellen Teil.

**) Herrn D. Grunow danke ich für die stete Einsatzbereitschaft bei der Herstellung der Gaschromatogramme und die gute Zusammenarbeit!

2.5.1.1. Konzentrationsänderungen im Blut

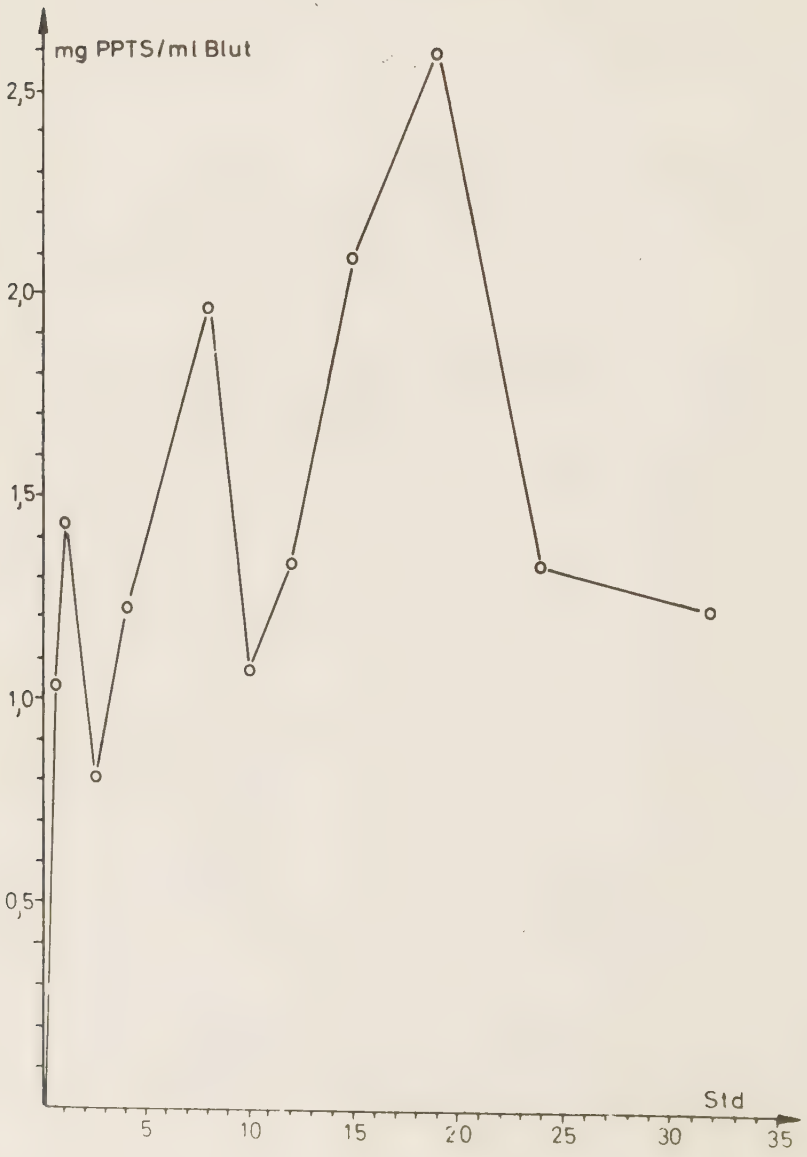
In der folgenden Tabelle sind die im Blut gemessenen PPTS-Konzentrationen enthalten.

Zeit h	Gesamt-Gewicht der Tiere g	Extrahierte Blutmenge in ml	mg PPTS/ml Blut
0,5	380	8	1,04
1	381	8	1,44
2,5	384	9	0,81
4	357	9	1,22
8	350	9	1,96
10	336	8,7	1,08
12	340	9	1,33
15	345	8	2,08
19	317	8	2,58
24	334	8	1,33
32	345	9	1,22

Die Tabelle gibt den Zeitpunkt der Dekapitierung des Tiermaterials, die aufgefangene und extrahierte Gesamtmenge Blut, das Gesamtgewicht der Tiere und die gefundene Konzentration PPTS in Milligramm pro Milliliter Blut an.

Abb. 2:

Grafische Darstellung der gemessenen Werte



Blutspiegel der PPTS, gemessen über einen Zeitraum von 32 Std. nach einmaliger Gabe von 50 mg/Tier entsprechend 277 mg Substanz pro kg Tier bei einem durchschnittlichen Rattengewicht von 180 g.
Die Applikation erfolgte oral.

2.5.1.1.1. Beschreibung der PPTS-Blutspiegelkurve (Abb. 2)

Die PPTS erscheint innerhalb der ersten 30 Minuten im Blut. Die PPTS-Konzentration im Blut steigt in der folgenden halben Stunde um die Hälfte an. In den nächsten eineinhalb Stunden sinkt sie auf ein Minimum. Anschließend steigt sie wieder bis zur achten Stunde. Ein zweites Minimum an PPTS-Konzentration zeigt sich nach zehn Stunden. Das dritte und letzte Maximum wird nach neunzehn Stunden erreicht.
Von diesem Zeitpunkt an sinkt die PPTS-Konzentration von neuem ab. Die Steigung der Kurve verläuft nach vierundzwanzig Stunden nicht mehr so steil, sie zeigt einen deutlichen Knick.

Die Blutspiegelkurve verläuft bei dieser Substanz offenbar nicht geradlinig, sondern wellenförmig oder sogar sägezahnartig mit charakteristisch ausgeprägten Maxima und Minima. Ähnliche Verhältnisse fand BLATRIX [11] bei Versuchen mit Sintrom, die er 1968, allerdings am Menschen, durchführte.

Er stellte fest, daß die maximale Konzentration von Sintrom nach drei bis sechs Stunden im Blut erreicht war. (Abb. 3)

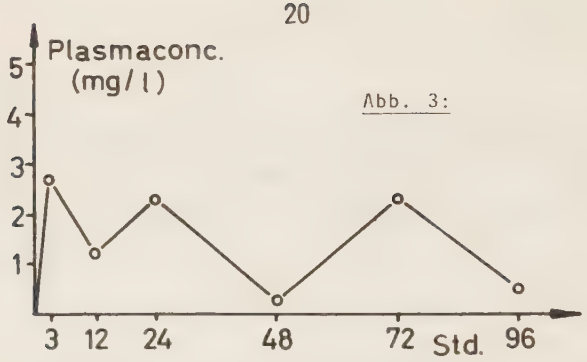


Abb. 3:

Plasmakonzentration nach einmaliger oraler Gabe von 24 mg Sintrom nach BLATRIX. (Abb. 3)

Sie sank in Abhängigkeit von der individuellen Metabolisierungsrate nach zwölf bzw. vierundzwanzig Stunden auf ein Minimum, anschließend folgten noch einige sekundäre Peaks. Die Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die PPTS-Blutspiegelkurve.

2.5.1.1.2. Pharmakologische Auswertung

Aus der Blutspiegelkurve geht hervor, daß die Substanz bedeutend früher im Blut erscheint, als nach der Zeit/Wirkungskurve zu erwarten war.

Die Resorption setzt demnach gleich nach Applikation der Substanz ein. Das Ende der Resorption ist schwer abzuschätzen. Sie könnte nach einem der beiden ersten Maxima beendet sein, das würde bedeuten, nach einer beziehungsweise acht Stunden. Der letztere Zeitraum scheint für eine Substanz, die so rasch resorbiert wird, zu hoch gegriffen.

Der erste Peak ist dagegen sehr niedrig. Wäre die PPTS-Konzentration zu diesem Zeitpunkt doppelt so hoch, so könnte die Resorption als beendet angesehen werden.

Die Elimination erfolgt nicht kontinuierlich, sondern schubweise. Die zeitlichen Abstände zwischen den höchsten Substanzkonzentrationen vergrößern sich mit zunehmender Zeit.
Das erste Maximum tritt nach einer Stunde auf, das zweite acht Stunden, das dritte neunzehn Stunden nach der Applikation. Nach vierundzwanzig Stunden verlangsamt sich die Elimination.
In seiner bereits erwähnten Arbeit stellte BLATRIX fest, daß die Resorption von Sintrom nach zwölf bzw. vierundzwanzig Stunden beendet war. Die stark von einander abweichenden Zeitangaben sind durch die spezifische, individuelle Resorption verursacht. Die Elimination verlief polyphasisch.
Interessanterweise verlief die Elimination auch nach intravenöser Applikation biphasisch, obwohl Einflüsse der Resorption ausgeschlossen waren.
Marcumar, Tromexan und Warfarin werden dagegen auf andere Art aus dem Plasma eliminiert. Hier erfolgt die Elimination kontinuierlich und läßt sich in einer Geraden darstellen.

2.5.1.2. Konzentrationsänderungen in der Leber

Die folgende Tabelle enthält die in der Leber gemessenen PPTS-Konzentrationen.

Zeit h	Ges.-Gewicht der Tiere g	Ges.-Gewicht Leber g	mg PPTS/g Leber
0,5	380	10,8	2,53
1	381	12,13	3,12
2,5	384	10,8	0,97
4	357	9,4	1,74
8	350	8,6	3,33
10	336	8,53	2,23
12	340	8,6	2,55
15	345	10	4,87
19	317	8,9	5,17
24	334	9,3	3,26
32	345	9,2	2,57

Die Tabelle gibt den Zeitpunkt der Dekapitierung des Tiermaterials, das Gesamtgewicht der Tiere, das Gesamtgewicht der extrahierten Leber und die gefundene Konzentration PPTS in Milligramm pro Gramm Leber an. Die Dosierung und Art der Applikation entsprechen den bei der Blutspiegelkurve gemachten Angaben.

Abb. 4:

Graphische Darstellung der in der Leber gemessenen PPTS-Konzentrationen.

Leberwerte der PPTS gemessen über einen Zeitraum von 32 Std. nach einmaliger oraler Applikation von 50 mg pro Tier entsprechend 277 mg Substanz pro kg Tier.

2.5.1.2.1. Beschreibung des Kurvenverlaufs der PPTS-Konzenzentration in der Leber. (Abb. 4)

Die graphische Darstellung der Leberwerte entspricht dem Verlauf der Blutspiegelkurve.
Die PPTS erscheint nach dreißig Minuten in der Leber, Konzentrationsmaxima und Minima tauchen zur selben Zeit auf wie im Blut. Der Kurvenverlauf ist ebenfalls biphasisch, allerdings sind die maximalen Konzentrationen der PPTS in der Leber etwa doppelt so hoch wie die entsprechenden Konzentrationen im Blut.

2.5.1.2.2. Pharmakologische Auswertung

Der Vergleich der Blutspiegelkurve und der Kurve der in der Leber gemessenen Konzentrationen bestätigt die Richtigkeit der Annahme, daß die Blutspiegelkurve unter den erwähnten Bedingungen die kinetischen Abläufe am Wirkort, in diesem Fall der Leber, reflektiert.
Auffällig ist die große Affinität der Substanz zur Leber, so daß von einer Depotwirkung der Leber für die PPTS gesprochen werden kann.

Aus der Kurve wird ersichtlich, daß die Ausscheidung der PPTS kein einheitlicher Vorgang ist, sondern nach unterschiedlichen Mechanismen erfolgen muß, die sich in der Geschwindigkeit ihres zeitlichen Verlaufs unterscheiden.

Die schnelle Komponente liegt sicher in den mit großer Geschwindigkeit ablaufenden Reaktionen einer intensiven Biotransformation begründet, deren Wichtigkeit hier zu Tage tritt, während die langsame Komponente in den bei der Ausscheidung durch die Nieren auftretenden Diffusionsmechanismen zu suchen ist.

Die Leber erfüllt für die PPTS drei Aufgaben: Sie ist Wirkort, Ort der Biotransformation und Depot.

Auch die Depotwirkung der Leber kann die PPTS-Elimination beeinflussen. Sie würde sich durch einen langsamen, kontinuierlichen Ausstrom aus der Leber bemerkbar machen. Tatsächlich verlangsamt sich die PPTS-Ausscheidung nach vierundzwanzig Stunden. Es läßt sich feststellen, daß die PPTS-Ausscheidung ein sehr komplexer Vorgang ist.

2.5.1.3. PPTS-Konzentrationsänderungen in Harn und Faeces

Tabelle der im Harn gemessenen PPTS-Konzentrationen

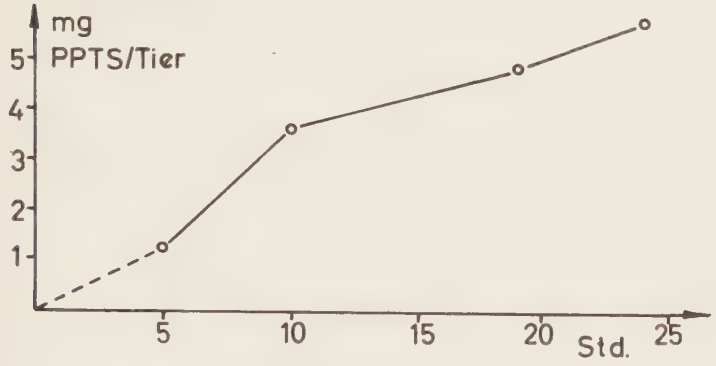
	5 h	10 h	19 h	72 h
PPTS / Tier	1,27 mg	3,63 mg	4,8 mg	14,4 mg

Der Harn zweier Tiere wurde 5, 10, 19 und 72 Stunden nach Applikation der Substanz gesammelt, die Substanzkonzentration gemessen. Das Gewicht der Tiere betrug durchschnittlich 180 Gramm. Die Werte geben die nach der angegebenen Zeit ausgeschiedene Menge PPTS wieder.
Weil nach der vom einzelnen Tier nach bestimmter Zeit ausgeschiedenen Menge PPTS gefragt war und nicht nach der in einem bestimmten Volumen Harn enthaltenen PPTS-Konzentration entfiel die Angabe von Milligramm PPTS pro Milliliter Harn.
Die Ausscheidung freier PPTS im Harn ließ sich schwerer quantifizieren, weil sich der Harn zu den vorgegebenen Zeiten nur durch Anlegung eines Katheters hätte gewinnen lassen. Der Harn wurde daher über größere Zeitabstände gesammelt. Aus diesem Grund stehen weniger Meßwerte zur Verfügung. Sie dürften aber ausreichen, um Anhaltspunkte über die renale Elimination der PPTS, insbesondere die Geschwindigkeit, zu geben.

2.5.1.3.1. Beschreibung des Kurvenverlaufs der im Harn gemessenen PPTS-Konzentration

Kurve der im Harn gemessenen PPTS-Konzentrationen (Abb. 5)

Abb. 5:



Ausscheidung der PPTS im Harn.

Stellt man die erhaltenen Werte in einer Kurve dar, so resultiert daraus keine durchgehende Gerade, sondern die Steigung der Geraden wechselt. (Abb. 5)
Der erste Teil der Kurve, der die Zeit von fünf bis zehn Stunden wiedergibt, verläuft bedeutend steiler als das Mittelstück der Kurve zwischen zehn und neunzehn Stunden. Anschließend verändert sich die Steigung erneut, sie wird wieder steiler.

2.5.1.3.2. Pharmakologische Auswertung

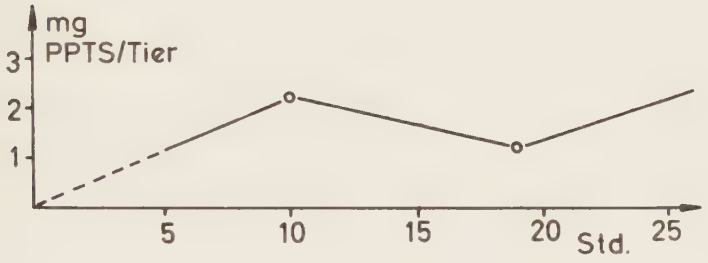
Der Kurvenverlauf zeigt, daß die renale Ausscheidung der PPTS sehr früh einsetzt.
Nach fünf Stunden sind 1,27 mg PPTS/Tier im Harn meßbar. Nach zehn Stunden ist die ausgeschiedene Menge PPTS auf 3,6 mg/Tier angestiegen. Nach neunzehn Stunden liegen im Harn 4,8 mg PPTS vor. Das sind 9,6 % der verfütterten Menge PPTS.
Nach 72 Stunden wurde keine freie PPTS mehr ausgeschieden. 14,4 mg PPTS/Tier oder 28,8 % der applizierten Menge wurden zu diesem Zeitpunkt im Harn gefunden.
Die Substanz erscheint während der ersten Stunden nicht in höherer Konzentration im Harn, wie es bei Sekretion in den Tubuli zu erwarten wäre.
Die Ausscheidungsgeschwindigkeit verläuft in verschiedenen Phasen. Besonders deutlich wird die unterschiedliche Ausscheidungsgeschwindigkeit, wenn die Zuwachsrate an freier PPTS aufgetragen wird, die sich aus den Differenzbeträgen der einzelnen Werte ergibt. Die Kurve verläuft dann wellenförmig.

Werte:

	5 h	10 h	19 h	72 h
PPTS / Tier	1,27 mg	2,36 mg	1,17 mg	9,6 mg

Kurve aus den Differenzbeträgen der gemessenen Harnwerte (Abb. 6)

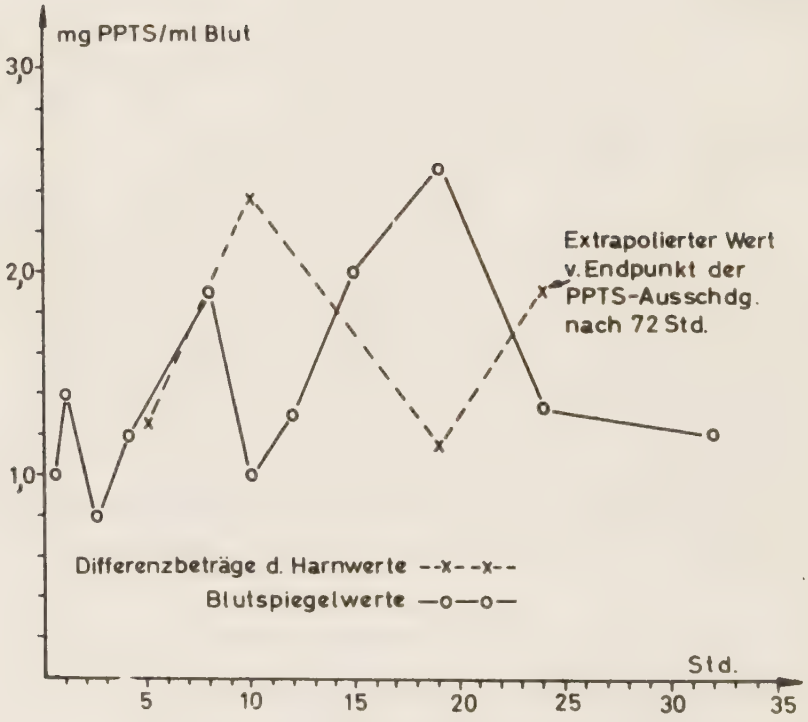
Abb. 6:



Auf eine initiale schnelle Ausscheidungsphase, die von der fünften bis zur zehnten Stunde dauert, folgt eine Phase langsamer Ausscheidung. Nach neunzehn Stunden erhöht sich die Ausscheidungsgeschwindigkeit von neuem. In diesem Zeitraum werden bis zum Ende der renalen Ausscheidung nach 72 Stunden 9,6 mg/Tier entsprechend 66,6 % der gesamten frei ausgeschiedenen PPTS mit dem Harn eliminiert. (Abb. 6)

Vergleicht man die Kurve der Differenzbeträge aus den Harnwerten mit der Blutspiegelkurve, so entsprechen die im Harn ausgeschiedenen Konzentrationen freier PPTS über einen bestimmten Zeitraum spiegelbildlich der Blutspiegelkurve. (Abb. 7)

Abb. 7:



Blutspiegelkurve und Kurve aus den Differenzbeträgen der gemessenen Harnwege.

Eine hohe Konzentration freier PPTS wird im Harn dann erreicht, wenn die Konzentration im Blut niedrig ist.
Umgekehrt ist die PPTS-Konzentration im Harn niedrig, wenn die Konzentration im Blut hoch ist. Offensichtlich findet im vorliegenden Fall ein Rückstrom von PPTS ins Blut statt. Diese PPTS kann aus Geweben stammen, die PPTS in hoher Konzentration enthalten. Hier käme vor allem die Leber in Frage.
Die hier gemessenen PPTS-Maxima entsprechen aber zeitlich den PPTS-Maxima im Blutspiegel. Es ist daher denkbar, daß der erneute Anstieg der PPTS im Blut durch Rückresorptionsprozesse in der Niere und den ableitenden Harnwegen verursacht wird.

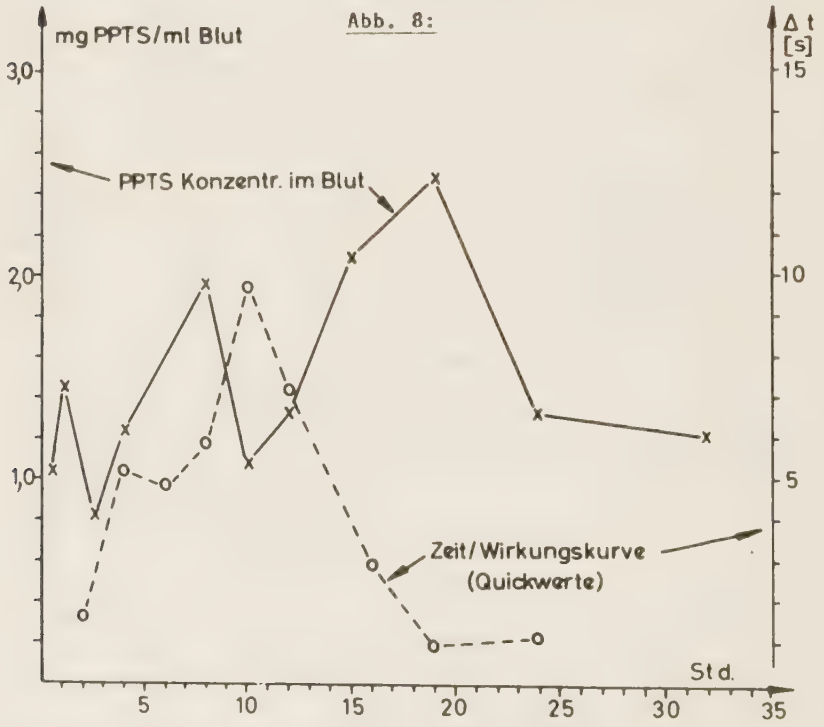
2.5.1.4. PPTS-Konzentration in den Faeces

In den Faeces wurde keine freie PPTS ermittelt.
Offenbar ist die renale Elimination der Hauptweg bei der Ausscheidung der PPTS, die in freier Form vorliegt.

2.5.2. Konzentrationsänderung und Wirkung

Bei einem Vergleich der Zeit/Wirkungskurve mit den Kurven der in Blut und Leber gemessenen PPTS-Konzentrationen läßt sich feststellen, daß maximale Blut- bzw. Leberkonzentrationen nicht mit dem Zeitpunkt maximaler Wirkung der Substanz zusammentreffen. (Abb.8) Zeit/Wirkungskurve und Blutspiegelkurve zusammen projiziert. (Abb. 8)

Abb. 8:

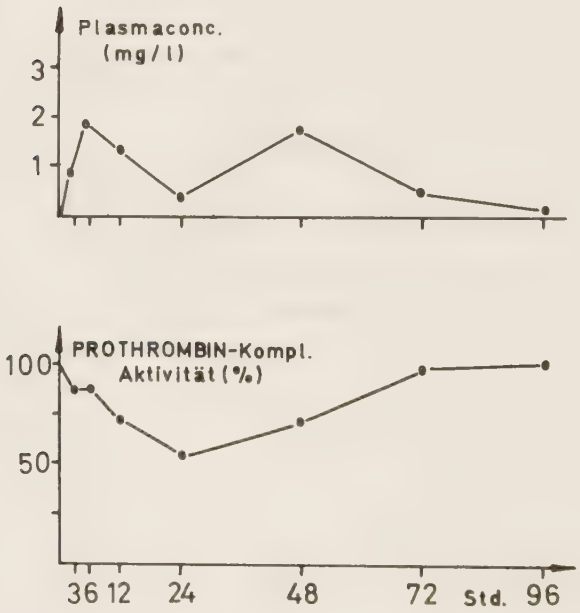


Die am längsten andauernde Senkung des Quickwertes tritt in der Zeit/Wirkungskurve zehn Stunden nach Applikation der Substanz auf. Zu diesem Zeitpunkt durchläuft die PPTS-Konzentration im Blut ein Minimum. Die Konzentration am Wirkort ist zwar doppelt so hoch wie im Blut, aber relativ zur PPTS-Konzentration in der Leber ebenfalls ein Minimum. Zwei Stunden vorher zeigte sich dagegen in Blut und Leber ein Konzentrationsmaximum.

Es muß also eine Phasenverschiebung eingetreten sein. Dieses ungewöhnliche Verhalten steht im Widerspruch zu der Regel, daß maximale Wirkstoffkonzentration am Wirkort auch maximale Wirkung bedingt. Weil die Leber der Wirkort der PPTS ist, wäre die Annahme berechtigt, daß eine Änderung in der Blut/Leber Verteilung der Substanz auch eine Änderung der Wirkungsintensität zur Folge haben muß. Das ist, wie aus den Kurven hervorgeht, nicht der Fall. BLATRIX beobachtete bei seinen Untersuchungen an Sintrom ebenfalls eine zeitliche Verschiebung von Konzentrationsmaximum und Wirkungsmaximum. (Abb. 9)
Das wird in den von ihm nach unterschiedlicher Dosierung aufgenommenen Blutspiegelkurven besonders deutlich.
Bei niedriger Dosierung zeigen sich wenige Peaks in der Blutspiegelkurve, bei Erhöhung der Dosis um die Hälfte erscheint ein Peak mehr. Wird die Dosis etwas mehr als verdoppelt, verschwinden dagegen die sekundären Peaks fast. Der Zeitpunkt der maximalen Wirkung ändert sich nicht. Während die Zeit/Wirkungskurve fast stereotyp gleichbleibend verläuft, ändert sich die Blutspiegelkurve mit der Dosierung.

Hieraus ließe sich folgern, daß, in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und der Verfügbarkeit der Reaktionspartner, bei hoher Substratkonzentration, i.e. hoher Dosierung, Reaktionen einsetzen, die bei niedriger Dosierung nicht stattfinden. Es könnte dann zu Überlagerungen kommen, die zu einer Blutspiegelkurve ohne ausgeprägte Maxima führen.

Abb. 9:



Blutspiegel-Kurve von Sintrom und Prothrombin-Komplex-Aktivität nach BLATRIX.
Konzentrations-Maximum und Wirkungs-Maximum sind zeitlich verschoben.

2.5.3. Vorkommen der PPTS in anderen Geweben

Das Fettgewebe, zu dem die PPTS wegen ihrer lipophilen Eigenschaften eine besondere Affinität erwarten ließ, erwies sich nicht als Speicherorgan.
Die theoretischen Vorstellungen mußten an dieser Stelle korrigiert werden. In Milz und Nieren ließ sich, wie zu erwarten, PPTS nachweisen.
Untersuchungen an fetalem Gewebe ergaben interessanterweise, daß PPTS offenbar die Plazentabarriere - zumindest bei Ratten - nicht überschreitet.
Makroskopisch waren bei den Embryonen keine Veränderungen erkennbar, ebenso fanden sich keine vorzeitig abgestorbenen Embryonen, die auf eine toxische Einwirkung der PPTS hätten schließen lassen.

2.5.4. Diskussion der Ergebnisse

Die Signifikanz der Aussagen ist relativ zu sehen, zum einen, weil der Idealfall einer radioaktiv markierten Substanz sich nicht realisieren ließ, zum anderen, weil die neue und schwierig zu synthetisierende Substanz nur in begrenzter Menge zur Verfügung stand. Daher war es nicht möglich, die Untersuchungen in so großem Rahmen durchzuführen, wie es zur Erzielung noch genauerer Werte vielleicht erforderlich gewesen wäre. Dennoch läßt sich festhalten, daß die PPTS in ihrer Kinetik von Langzeitantikoagulantien wie Marcumar oder Warfarin offenbar wesentlich abweicht. Gemeinsamkeiten bestehen eher mit Kurzzeitantikoagulantien wie Sintrom. Besonders auffällig ist die hohe Konzentration von PPTS in Blut und Leber, die Stunden nach Eintritt der maximalen Wirkung gemessen wurde. Hier ist in Betracht zu ziehen, daß Wirkung und Kinetik, insbesondere die Biotransformation eines Pharmakon nicht nur starken artspezifischen, sondern auch individuellen Schwankungen unterworfen ist. Ein solcher Fall könnte auch hier vorliegen. Primäre Vermutungen, daß es sich bei der gemessenen Substanz statt um PPTS um einen Metaboliten gehandelt haben könnte, wurde durch Aufnahme von GC/MS-Spektren widerlegt. Ein wichtiger Faktor für die Ursache der kurzen Wirkungsdauer der Substanz scheint in ihrer geringen Eiweißbindung zu liegen, die zwar nicht direkt gemessen wurde, sich aber indirekt durch schnellen Einstrom in die Leber und rasches Abfluten bemerkbar machte. Strukturelle

Veränderungen der Substanz, die eine stärkere Eiweißbindung bewirken, sollten auch zu einer höheren pharmakologischen Effizienz im Sinne einer verlängerten Wirkungsdauer beitragen.
Die mehrphasisch verlaufenden Kurven der PPTS-Konzentrationen in Blut und Leber erschweren Aussagen über den Reaktionstypus, nach dem Resorption und Elimination vor sich gehen. Es ist nicht eindeutig zu erkennen, ob zum Beispiel eine Reaktion erster Ordnung vorliegt, bei der das Pharmakon entsprechend seiner Konzentration resorbiert und eliminiert wird. Diese Art der Kinetik gilt für viele Pharmaka. Aus den gleichen Gründen läßt sich die Halbwertzeit der Substanz schwer bestimmen.
Das Erscheinen mehrerer Peaks dürfte mit der Elimination, besonders der Biotransformation, in Zusammenhang stehen. Hierbei überlagern sich langsame Diffusionsprozesse mit schnell ablaufenden enzymatischen Reaktionen der Biotransformation.
Die nach neunzehn Stunden erfolgende Anhäufung von PPTS in Blut und Leber, die 66,6 % der ursprünglich applizierten Menge PPTS umfaßt (Etwa 10 mg PPTS/4 ml Blut und 23 mg PPTS/4,45 g Leber des Einzeltieres bei 50 mg PPTS/Tier), läßt sich durch Rückresorption der Substanz in der Niere und eventuell den ableitenden Harnwegen erklären.

Die Anzahl der Peaks kann dagegen, wie von BLATRIX gezeigt, mit der Dosierung variieren. Die Elimination selbst erfolgt hauptsächlich renal. Die Einschränkung ist deshalb erforderlich, weil keine Gallenfistel angelegt wurde und daher die Galle nicht

untersucht werden konnte. Somit ist die Rolle des enterohepatischen Kreislaufs bei der Elimination nicht geklärt. Andererseits fand sich in den Faeces keine freie PPTS.

Eine Bilanz über den Verbleib der Substanz aufzustellen, erscheint dann sinnvoll, wenn es möglich ist, auch alle Metaboliten quantitativ zu erfassen. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf die in den für orale Antikoagulantien interessanten Geweben Leber und Blut enthaltenen PPTS-Konzentrationen gerichtet. Mit diesen Festellungen ist nur der Verbleib der freien Substanz aufgehellt, über das Schicksal der restlichen Substanz muß eine Untersuchung ihrer Biotransformation Auskunft geben.

2.6. Biotransformation

Zur Erhaltung des in einem Organismus vorhandenen biologischen Fließgleichgewichtes ist es erforderlich, daß alle zugeführten Stoffe, ungeachtet ihrer energetischen Bedeutung für das biologische System, in irgendeiner Weise wieder entfernt werden.

Die Veränderungen, denen die inkorporierten Stoffe im Verlauf der Ausscheidung unterzogen werden, lassen sich im Begriff Biotransformation subsumieren. Ort der Biotransformation sind die körpereigenen Gewebe und der Magen-Darmtrakt.
Die Biotransformation kann sowohl durch nicht-enzymatische als auch enzymatische Reaktionen bewirkt werden. Die Endprodukte dieser Reaktionen besitzen sehr häufig eine verstärkte Wasserlöslichkeit, die wieder einer besseren Elimination dient.

2.6.1. Biotransformation von Antikoagulantien

2.6.1.1. Für die Biotransformation wichtige enzymatische Reaktionen

Enzymatische Reaktionen von Gruppierungen, die für den Stoffwechsel oraler Antikoagulantien vom Cumarintyp von Bedeutung sind:

Phenylrest:	Hydroxylierung
Methylgruppe:	Oxidation zum Alkohol
Phenolische OH-Gruppe:	Konjugation zum Glukuronid, Sulfat
Aromat. Karbonsäure:	Konjugation zum Glukuronid, Aminosäurekonjugation, Oxidation zum Phenol

2.6.1.2. Metabolismus des Cumaringerüstes

Cumarin wird von der Rattenleber hydroxyliert, der Lactonring gespalten. Zu den Metaboliten, die identifiziert werden konnten, gehören 3-, 5-, 7- und 8-Hydroxycumarine sowie o-Cumar-, o-Hydroxyphenylessig-, o-Hydroxyphenylmilchsäure **12**) **13**) **14**) **15**)

Nach GIBBS **16**) verläuft der Weg zur o-Hydroxyphenylmilchsäure über 3-Hydroxycumarin und o-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, ein Nebenweg führt vom Cumarin über o-Cumarinsäure zur o-Cumarsäure und o-Hydroxyphenylmilchsäure. Aus ihr entsteht durch Decarboxylierung o-Hydroxyphenylessigsäure.

Umbelliferon wird in β-Resorcylsäure und nach β-Oxidation über 2,4-Dihydroxyzimtsäure in 2,4-Dihydroxybenzoesäure umgewandelt [17].

2.6.1.3. Metabolismus einiger in der Praxis angewandter oraler Antikoagulantien vom Cumarintyp

Eines der am häufigsten untersuchten, weil am besten zugänglichen, Antikoagulantien, ist Warfarin. Nach oraler bzw. intravenöser Applikation am Menschen wurden aus dem Harn 6- und 7-Hydroxywarfarin und zwei diastereomere Warfarinalkohole isoliert [18] [19] [20].

Äthylbiscumacetat wird vom Kaninchen als Carbonsäure ausgeschieden LINK et al. [1]. Der menschliche Organismus scheidet dagegen Äthylbiscumacetat als in 7-Stellung des Benzolringes hydroxyliertes Produkt aus [21] [22].

Vom nahe verwandten Dicumarol ist nur bekannt, daß Rattenlebermikrosomen einen Metaboliten erzeugen, dessen Struktur jedoch noch nicht aufgeklärt werden konnte [23].
Marcumar wird, wie auch aus eigenen Untersuchungen hervorging, als Glukuronid eliminiert.
Von weiteren therapeutisch genutzten Antikoagulantien scheinen keine Untersuchungen über Metabolisierung vorzuliegen.

2.6.2. Biotransformation von PPTS

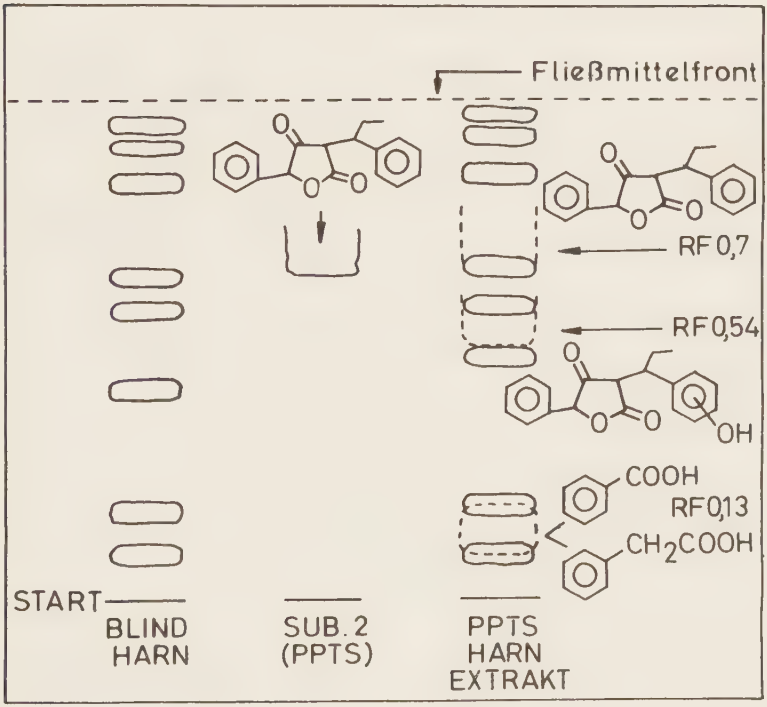
Als mögliche Wege der Biotransformation wurden für PPTS die Ausscheidung als freie Substanz sowie Glukuronidierung und Hydroxylierung in Betracht gezogen. Das Hauptaugenmerk bei der Suche nach Stoffwechselprodukten der PPTS richtete sich zunächst auf die Eliminierung freier Substanz in Harn und Faeces.

Jeweils fünf Ratten wurden mit 50 mg PPTS/Tier gefüttert und fünf Tage lang im Stoffwechselkäfig bei Standardnahrung gehalten. Die in dieser Zeit anfallende Menge Harn und Faeces wurde getrennt gesammelt und mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Die Extrakte wurden anschließend mit Hilfe der DC untersucht.

2.6.2.1. Ausscheidung im Harn

Nach Entwicklung der Chromatogramme zeigte sich folgendes Bild des Harnextraktes:

Abb. 10:



Blindharnextrakt und Harn mit PPTS behandelter Tiere nebeneinander aufgetragen. Zwischen beiden Extrakten PPTS als Referenzsubstanz.

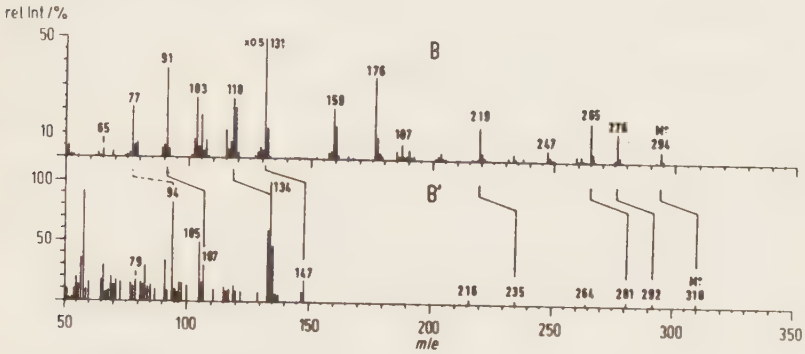
2.6.2.2. Freie PPTS und hydroxylierter Metabolit (Abb. 10)

Im Vergleich zum Blindharn erscheinen im PPTS-Harn zwei charakteristische Flecke: Ihr RF-Wert liegt bei 0,7 und 0,54. Der RF-Wert 0,7 war mit dem der Referenzsubstanz PPTS identisch. Die in diesen Flecken enthaltenen Substanzen wurden durch präparative Dünnschicht isoliert und anhand ihrer Massenspektren identifiziert. Die Massenspektren der Rf-gleichen Substanzen stimmten überein. Die Substanz mit dem niedrigeren Rf-Wert wurde auf gleiche Weise als hydroxyliertes PPTS-Derivat identifiziert.

2.6.2.3.

Massenspektrometrischer Abbau der PPTS und des hydroxylierten Metaboliten.

Abb. 11:



Massenspektrum der PPTS und des hydroxylierten Metaboliten

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die PPTS mit dem Großbuchstaben B gekennzeichnet, das Hydroxylierungsprodukt mit B'. Die Fragmentierung von B ist bereits von Wagenknecht in seiner schon erwähnten Arbeit eingehend beschrieben worden. Das Molekulargewicht des Metaboliten ist um 16 u höher als das der Ausgangssubstanz (Abb.11). Diese Massendifferenz weist auf Sauerstoff hin, der in das Molekül eingebaut wurde, wie das bei Hydroxylierungen der Fall ist. Der Vergleich der Massenspektren von B mit B' zeigt, daß die Spektren Schlüsselbruchstücke enthalten, von denen einige bei der hydroxylierten Substanz um 16 u höher registriert wurden. Das Hydroxylierungsprodukt zeigt ein Fragmentierungsverhalten, das die Anwendung des Biemannschen Verschiebungssatzes [24] erlaubt. Eine Änderung des Fragmentierungsmusters zeigt sich demgegenüber besonders deutlich dort, wo die Hydroxylgruppe andere Fragmentierungswege erlaubt.

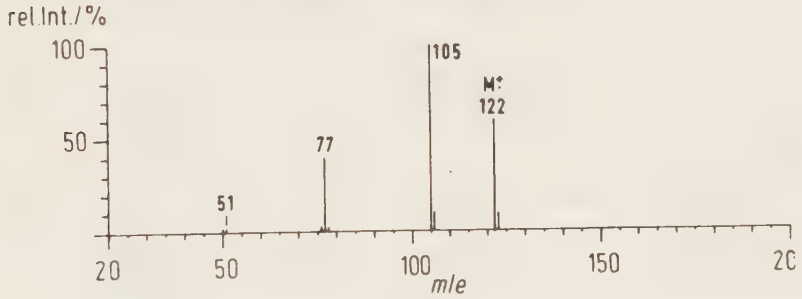
So erscheint gemäß dem Biemanschen Verschiebungssatz das Analogon des Tropylium-Ion (m/e 91), das Hydroxytropylium, bei (m/e 107), respektive das Analogon zu m/e 77 bei m/e 93. Die Bildung von m/e 79, wie sie in A' mit einiger Intensität beobachtet wird, ist jedoch nur bei dieser Substanz möglich und daher für sie spezifisch.

2.6.2.4. Benzoesäure und Phenylessigsäure

Der PPTS-Extrakt unterschied sich durch einen weiteren Fleck vom Blindharn. Der Rf-Wert dieses Fleckes beträgt 0,13. Seine Intensität ist stärker von der Dosierung abhängig als die Intensität der PPTS. Bekamen die Ratten eine PPTS-Menge, die in der Nähe der Dosis letalis lag, also bei etwa 75 mg/Tier entsprechend 416 mg/kg Tier, war bei gleicher aufgetragener Menge Harnextrakt die Intensität, mit der der Fleck im Chromatogramm erschien, groß, bei niedriger Dosierung war nur der von der PPTS stammende Fleck deutlich erkennbar.
Der niedrige Rf-Wert ließ vermuten, daß dieser Fleck eine polare Substanz enthalten müsse. Diese Annahme bestätigte sich. Allerdings handelte es sich nicht um eine einheitliche Substanz sondern um ein Gemisch zweier Substanzen mit fast gleichem Rf-Wert. Der Fleck wurde mehrmals in einer Fließrichtung chromatografiert bis zur Auftrennung des Substanzgemisches, anschließend wurde die Platte um 90^{o} gedreht und erneut chromatografiert um die Trennung zu optimieren. Dieses Vorgehen ermöglichte es, beide Substanzen zu isolieren.

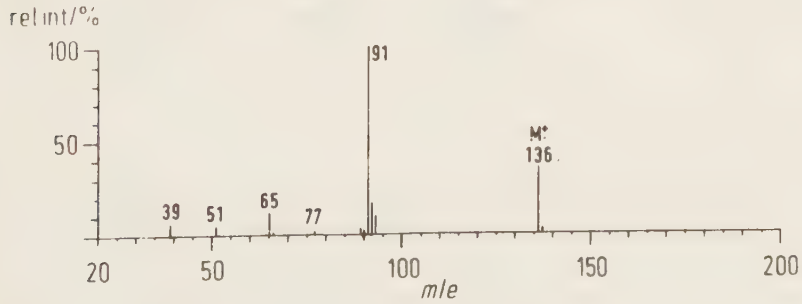
Die Auswertung der Massenspektren zeigte, daß es sich bei den isolierten Produkten um Benzoesäure (4) und Phenylessigsäure (5) handelte. Benzoesäure wurde auch aus dem Stoffwechsel von anderen, ähnlichen Naturstoffen isoliert [25].

Massenspektrum von Benzoesäure Abb. 12:



Aus dem Molekül-Ion m/e 122 wird $OH^{\bullet}$ abgespalten. Daraus resultiert das Oniumprodukt m/e 105. Die anschließende Eliminierung von CO führt zu dem Ion m/e 77. Aus diesem Fragment-Ion entsteht durch Abspaltung von Acetylen m/e 51.(Abb. 12)

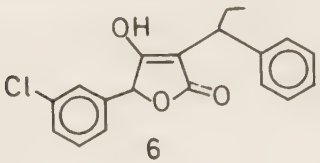
Massenspektrum von Phenylessigsäure Abb. 13:



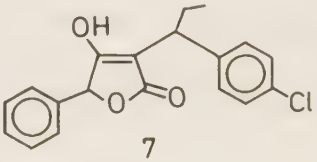
Durch Tropyliumspaltung wird aus dem Molekül-Ion m/e 136 das Tropylium-Ion m/e 91 gebildet. Anschließende Eliminierung von zweimal Acetylen führt zu den Ionen mit m/e 65 und m/e 39.(Abb. 13)

2.6.2.5. Herkunft der beiden aromatischen Carbonsäuren

Damit stellte sich die Frage nach der Herkunft beider Säuren und ihrem Zusammenhang mit dem Stoffwechsel der PPTS.
Zur Klärung dieses Problems wurde in einem in vitro Versuch PPTS mit MnO_2 in Chloroform gelöst und 24 Stunden bei Zimmertemperatur umgesetzt. Aus dieser Lösung konnte Benzoesäure isoliert werden. In der Wiederholung des Versuchs mit 5-Phenyltetronsäure wurde ebenfalls Benzoesäure isoliert. Die Benzoesäure stammte demnach zumindest auch aus diesem Teil des PPTS-Moleküls. Für den Nachweis, daß beide aromatischen Carbonsäuren aus dem Stoffwechsel der PPTS stammen, war es erforderlich, das PPTS-Molekül zu markieren. Da es aus technischen und finanziellen Gründen nicht möglich war, das Molekül radioaktiv zu markieren, wurde ein Chloratom als Tracer in das Molekül eingeführt. Beide Phenylringe des Moleküls wurden jeweils in para-Stellung substituiert.



6

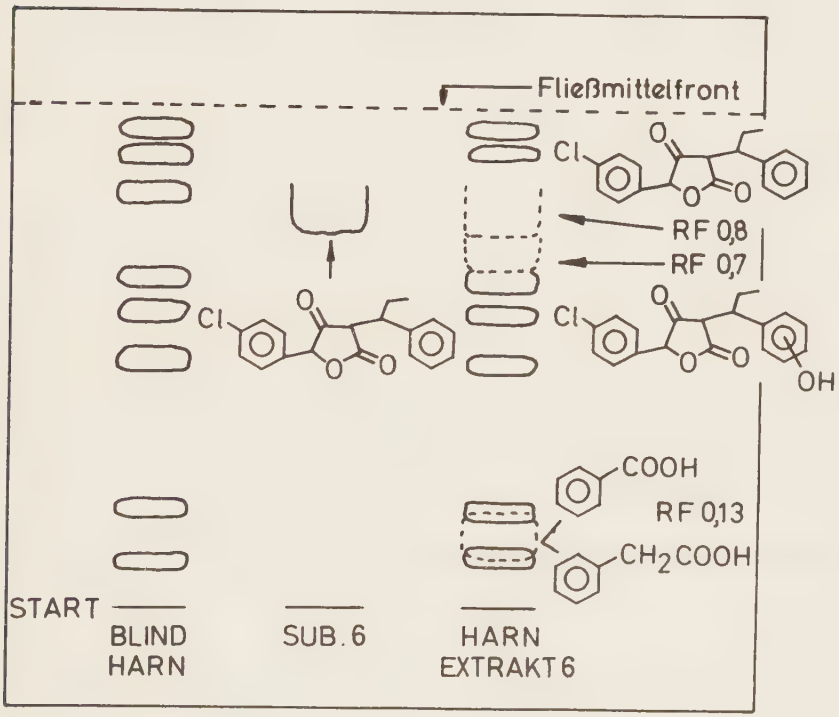


7

Die Substanzen 6 und 7 wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit ebenfalls mit den Großbuchstaben A für 6 und C für 7 gekennzeichnet. Harnextrakte von Ratten, die mit den Substanzen A bzw. C gefüttert wurden, wiesen im DC die gleichen charakteristischen Flecke auf wie die PPTS-Extrakte. Die Rf-Werte unterschieden sich nur geringfügig.

DC der mit der Substanz A (6) behandelter Tiere.

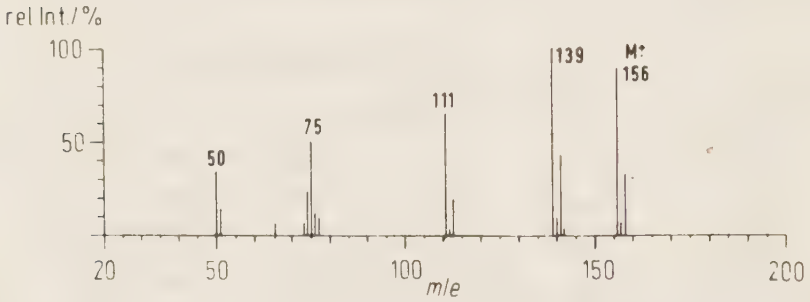
Abb. 14:



Blindharnextrakt und Harn mit Substanz A behandelter Tiere nebeneinander aufgetragen. Zwischen beiden Extrakten Substanz A als Referenz-Substanz. (Abb. 14)

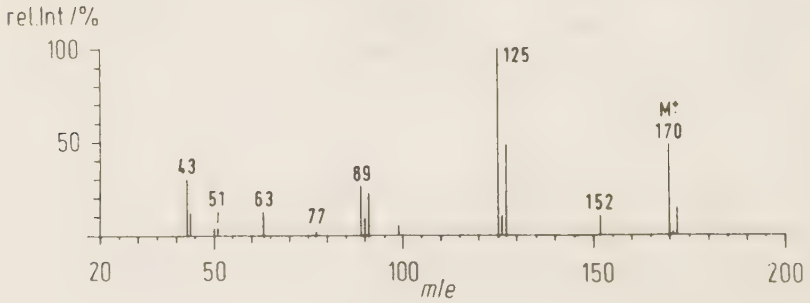
Im Harn von Tieren, die mit der Substanz A behandelt wurden, ließen sich p-Chlorbenzoesäure (8) und p-Chlorphenylessigsäure (9) massenspektrometrisch nachweisen.

Massenspektrum von p-Chlorbenzoesäure Abb. 15:



Das Molekül-Ion wird durch einen Peak bei m/e 156 angezeigt. Der Hauptabbauweg verläuft wie bei der Benzoesäure über den Verlust von $OH^{\bullet}$ (m/e 139) durch Oniumspaltung. (Abb. 15)

Massenspektrum von p-Chlorphenylessigsäure Abb. 16:



Aus dem Molekül-Ion m/e 170 wird das Chlortropylium-Ion (m/e 125) durch Abspaltung von CO und OH gebildet. Als Folgeprodukte entstehen 125-C_2H_2 (m/e 99), 125-Cl (m/e 90), 125-HCl (m/e 89), 125-HCl-H_2C_2 (m/e 63).
Von geringer Intensität sind M-H_2O (m/e 152), $C_6H_5^{\bullet}$ (m/e 77) und $C_4H_3^{\bullet}$ (m/e 51). (Abb. 16)

Im Harn von Tieren, die mit der Substanz C gefüttert wurden, konnten weder p-Chlorbenzoesäure noch p-Chlorphenylessigsäure nachgewiesen werden, sondern nur die nichtchlorierten Produkte. Damit ist der Beweis erbracht, daß beide Säuren ebenso wie ihre Chloranaloga im Stoffwechsel gebildet werden. Sie entstammen dem Phenyltetronsäure-Teil des PPTS-Moleküls.

Aus den Harnextrakten der mit den Substanzen A und C gefütterten Tiere wurden außerdem die freien Substanzen A und C sowie die hydroxylierten Produkte A'(II) und C' (12) massenspektrometrisch nachgewiesen. (Abb. 17)

Abb. 17:

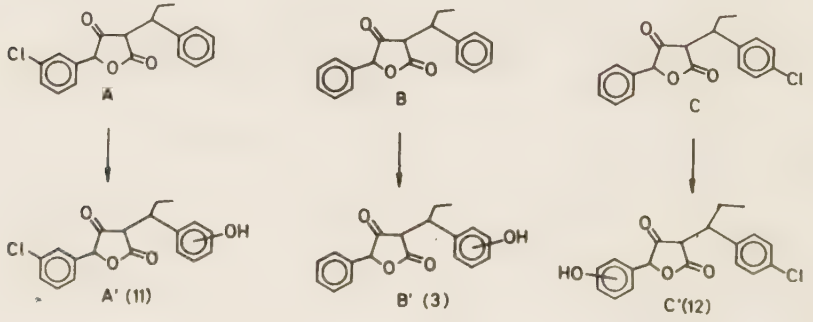
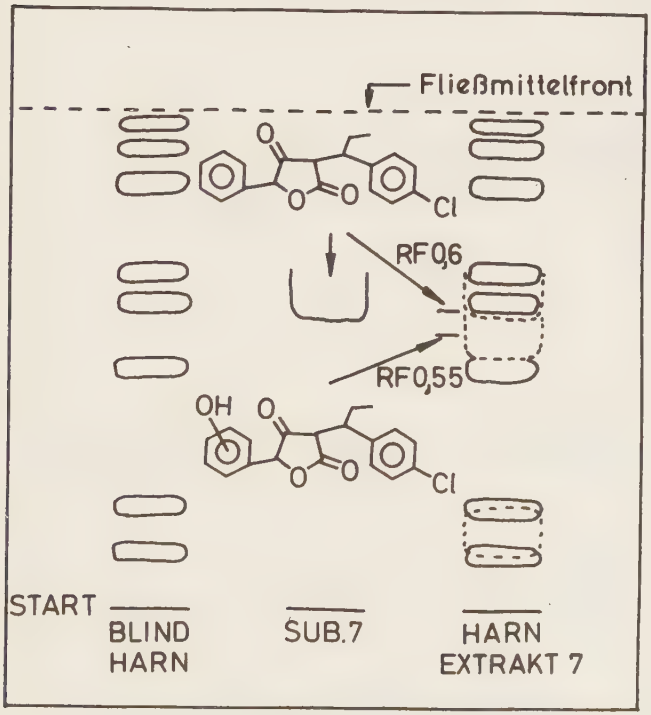


Abb. 18:

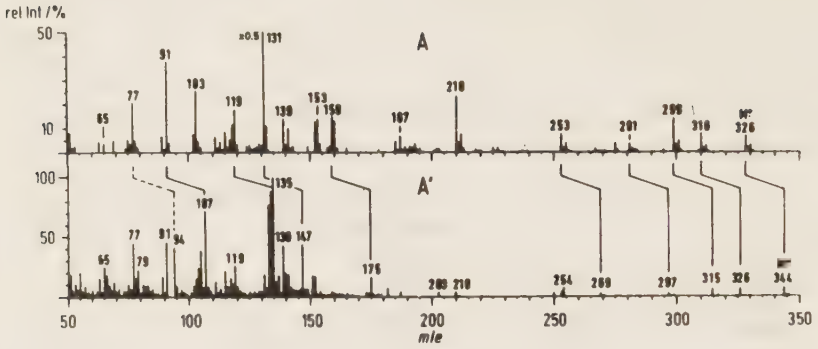
DC der mit der Substanz C (7) behandelten Tiere



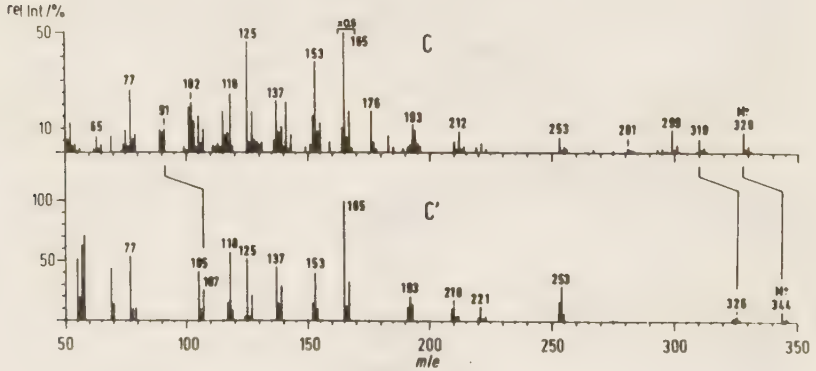
Die Zahl der charakteristischen Flecke ist gleich, die Rf-Werte variieren unwesentlich.

Blindharnextrakt und Harn mit Substanz C behandelter Tiere nebeneinander aufgetragen. Zwischen beiden Extrakten Substanz C als Referenz-Substanz. (Abb. 18)

Massenspektrum A, A' Abb. 19:



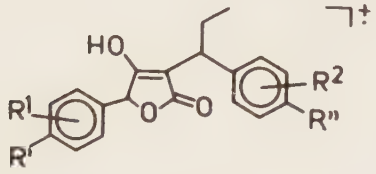
Massenspektrum C, C' Abb. 20:



Für alle Spektren gilt das bereits bei B, B' gesagte. Aus den bei der Fragmentierung erscheinenden charakteristischen Bruchstücken lassen sich Rückschlüsse auf den Ort der Hydroxylierung ziehen. Die Stellung der Hydroxylgruppe im Ringsystem ist allerdings auf diese Weise nicht zu bestimmen. Die Substanzen A und B werden, wie sich aus den Spektren ergibt, im Phenylring der Phenylpropyl-Gruppe hydroxyliert. (Abb. 19 und 20) Für die Substanz C kann gefolgert werden, daß hier der der Tetronsäure benachbarte Phenylring die Hydroxylgruppe enthält.

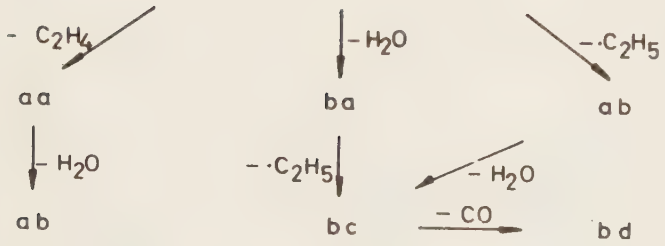
2.6.2.6. Fragmentierungsschemata

Abb. 21:
Hauptabbauwege für A, A', B, B', C, C'



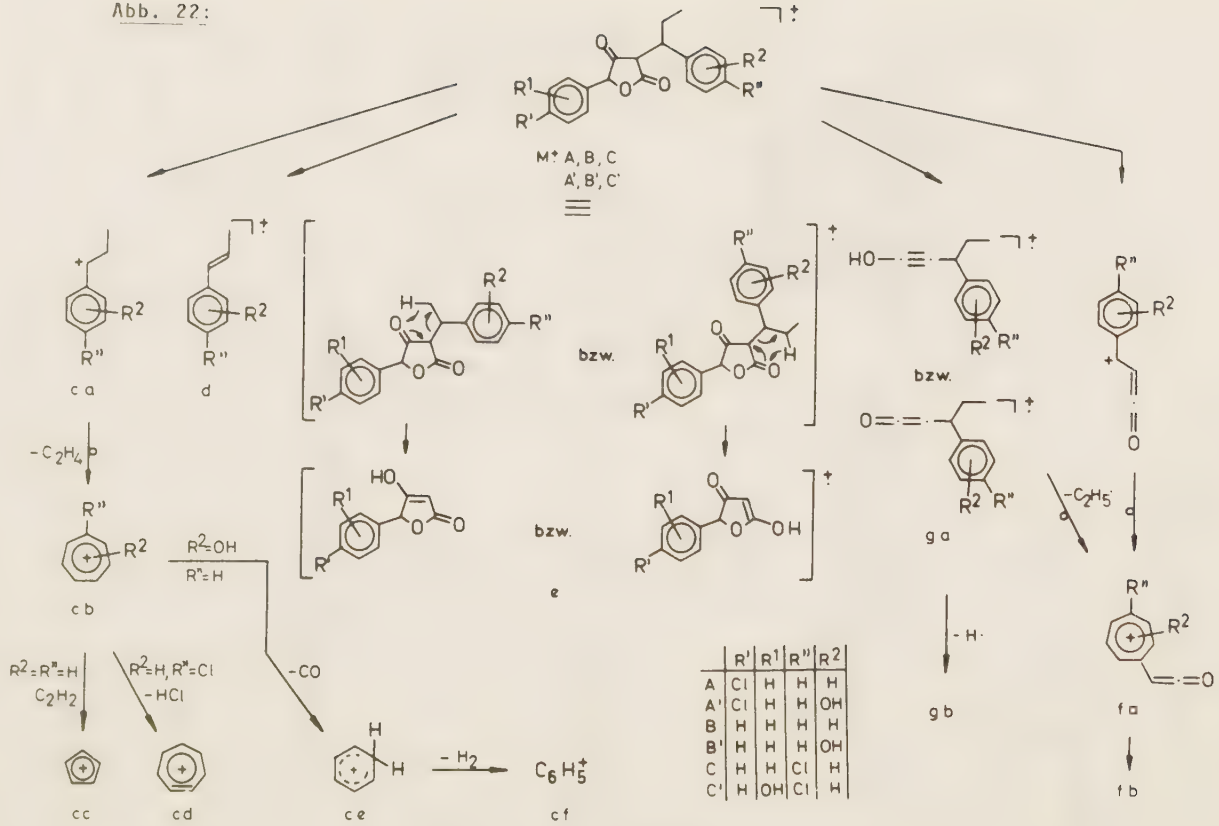
	R'	R1	R"	R2
A	Cl	H	H	H
A'	Cl	H	H	OH
B	H	H	H	H
B'	H	H	H	OH
C	H	H	Cl	H
C'	H	OH	Cl	H

$M^{+\cdot}$ A, B, C
A', B', C'



FRAGMENTIERUNGSSCHEMA 1

Abb. 22:



	R'	R¹	R"	R²
A	Cl	H	H	H
A'	Cl	H	H	OH
B	H	H	H	H
B'	H	H	H	OH
C	H	H	Cl	H
C'	H	OH	Cl	H

FRAGMENTIERUNGSSCHEMA 2

Tabelle der Schlüsselbruchstücke.

	A	A'	B	B'	C	C'
Mol/Peak m/e	328	344	294	310	328	344
aa	300	316	266	282	300	316
ab	282	298	248	264	282	298
ba	310	326	276	292	310	326
bb	299	315	265	281	299	315
bc	281	297	247	263	281	297
bd	253	269	219	235	253	269
ca	119	135	119	135	153	153
cb	91	107	91	107	125	125
cc	65	-	65	-	-	-
cd	-	-	-	-	89	89
ce	-	79	-	79	-	-
cf	-	77	-	77	-	-
d	118	134	118	134	152	152
e	210	210	176	176	176	192
fa	131	147	131	147	165	165
fb	103	119	103	119	137	137
ga	160	176	160	176	194	194
gb	159	175	159	175	193	193

Bei den nicht-hydroxylierten Substanzen sind die Bruchstücke ca, cb, cc, d, fa, fb, ga, gb für A und B identisch.

Bei den hydroxylierten Substanzen sind ca, cb, ce, cf, d, fa, fb, ga, gb gleich, werden aber um 16 u höher registriert als bei A und B. Die Hydroxylierung erfolgte bei A' und B' am Phenylring des Substituenten in 3-Stellung.

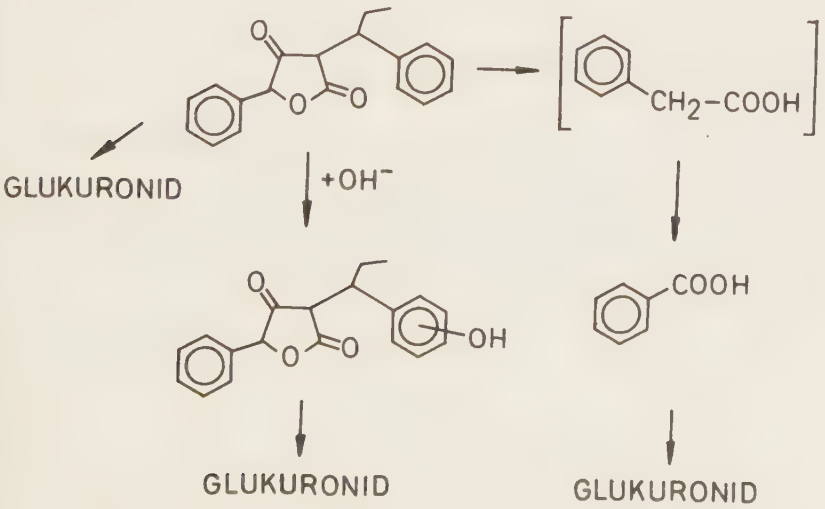
Dagegen sind die Fragment-Ionen ca, cb, cd, d, fa, fb, ga, gb bei C und C' gleich. Der Phenylring des Substituenten in 3-Stellung kann also bei C' nicht hydroxyliert worden sein. Für eine Hydroxylierung bietet sich noch der Phenylring in 5-Stellung an. Fragment-Ionen, die diesen Teil des Moleküls enthalten, müßten bei C' um 16 u höher erscheinen. Das wenn auch in sehr geringer Intensität erscheinende Fragment-Ion e bestätigt diese Annahme. (Abb. 21 und 22)

2.6.2.7. Metaboliten, die als Konjugate ausgeschieden werden

Die im Harn der mit PPTS gefütterten Tiere enthaltenen Glukuronide wurden enzymatisch gespalten und die Spaltprodukte extrahiert. Das DC dieses Extraktes entsprach dem des genuinen Harnextraktes. Wieder konnten PPTS, der hydroxylierte Metabolit und Benzoesäure isoliert werden.
Dasselbe war der Fall bei den Substanzen A und B.

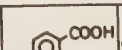
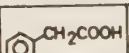
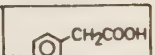
Die PPTS und ihre chlorierten Abkömmlinge werden demnach wie folgt eliminiert: Frei, hydroxyliert, als Benzoesäure und Phenylessigsäure. PPTS, der hydroxylierte Metabolit und Benzoesäure können auch als Glukuronide vorliegen. (Abb. 23)

Abb. 23:



2.6.2.8. Zusammenstellung der im Harn identifizierten PPTS-ausscheidungsformen

Abb. 24:

SUBST.	frei	gluk.	hy-droxy.	gluk.			gluk.		
6	+	+	+	+		+	+		+
2	+	+	+	+	+		+	+	
7	+	+	+	+	+		+	+	

Gluk. = Glukuronid der vorhergehenden Ausscheidungsform

Hydroxy. = Hydroxylierter Metabolit

2.6.3. Ausscheidung mit den Faeces

Dünnschichtchromatografisch ließen sich im Faecesextrakt weder freie PPTS noch andere Metaboliten nachweisen. Benzoesäure und Phenylessigsäure waren ebenfalls nicht nachweisbar.

2.6.4. Diskussion der Ergebnisse

Der erste Schritt zur Biotransformation der PPTS scheint in der Glukuronidierung der Substanz zu bestehen. Er fällt quantitativ gesehen am stärksten ins Gewicht. Das aus gaschromatografischen Werten errechnete Verhältnis frei ausgeschiedene Sustanz: PPTS-Glukuronid ist 1 : 1,33. Das bedeutet, daß die PPTS überwiegend als Glukuronid eliminiert wird.

Daneben erfolgt eine Hydroxylierung. Das hydroxylierte Ausscheidungsprodukt läßt sich bereits eine halbe Stunde nach Erscheinen der freien Substanz im Harn nachweisen. Es wäre interessant zu wissen, in welcher Stellung des Phenylringes der Phenylpropyl-Gruppe die Hydroxylierung stattfindet.

Einen Hinweis könnte der hydroxylierte Metabolit der Substanz B geben. Diese Substanz war im Phenylring der Phenylpropyl-Gruppe in para-Stellung chloriert. Die Hydroxylgruppe des Metaboliten ließ sich aber im Phenylring des Substituenten in 3-Stellung lokalisieren. Hieraus kann der Schluß gezogen werden, daß entweder der Chlor-Substituent den Ort der späteren Hydroxylierung blockiert hat oder elektronische Effekte eine Hydroxylierung an diesem Phenylring verhindern.

Der hydroxylierte Metabolit wird ebenfalls glukuronidiert.

Bis zu diesem Punkt entsprach der Verlauf der Biotransformation den Erwartungen.

Die Isolierung und Identifikation der beiden aromatischen Carbonsäuren Benzoesäure und Phenylessigsäure überraschte, weil sie sich einerseits, und das gilt in besonderem Maße für die Phenylessigsäure, nicht zwanglos in ein Abbauschema der PPTS integrieren ließen, andererseits ein Kausalzusammenhang zwischen diesen Substanzen nachgewiesen werden konnte. Beide Säuren können aus dem Phenyltetronsäure-Teil des PPTS-Moleküls stammen, wie aus den Versuchen mit der chlorierten PPTS hervorging.

Der Abbau der PPTS zu Benzoesäure und Phenylessigsäure könnte in folgender Weise verlaufen: Der Lactonring der Tetronsäure wird zwischen C_2 und dem Sauerstoff-Atom gespalten. Anschließende β-Oxidation führt zu Mandelsäure, die zu Benzoesäure decarboxyliert wird. Aus Mandelsäure würde durch Reduktion Phenylessigsäure entstehen. Eine Alternative könnte die Öffnung des Lactonringes zwischen C_5 und dem Sauerstoff-Atom bieten. Bei einer folgenden β-Oxidation würde Phenylessigsäure entstehen, die zu Benzoesäure decarboxyliert werden könnte.

Beide Vorschläge sind hypothetischer Natur. Mandelsäure konnte nicht isoliert werden, der Alternativvorschlag ist deshalb vorzuziehen. Hierbei entfällt auch die Hilfskonstruktion einer Reduzierung der Mandelsäure zu Phenylessigsäure. Hydroxylierte Phenylessigsäure entsteht auch beim Abbau von Quercetin im tierischen Organismus [26]. Die Möglichkeit einer β-Oxidation ist als real gegeben einzuschätzen, sie spielt beim Abbau des Umbelliferon eine Rolle. Allerdings besteht hier nicht das Problem einer α-Verzweigung wie bei der PPTS. Während Methyl-

gruppen bei einer α-Verzweigung die β-Oxidation nicht beeinträchtigen, stellt sich hier die Frage, ob die Fermentsysteme, welche die β-Oxidation katalysieren, unspezifisch genug sind, um auch mit einer aus einer Phenylpropyl-Gruppe bestehenden α-Verzweigung reagieren zu können.
Wie SCHELINE [27]) nachweisen konnte, ist die Biotransformation eines Pharmakon nicht an seinen eigentlichen Wirkort gebunden. Es besteht die Möglichkeit, daß das Pharmakon von der darmeigenen Mikroflora abgebaut wird. Dieser Tatbestand ist auch für die PPTS in Betracht zu ziehen. Benzoesäure und Phenylessigsäure wären in diesem Fall Abbauprodukte aus dem Stoffwechsel der Darmbakterien. Freie PPTS und ihre Spaltprodukte ließen sich aus den Faeces jedoch nicht isolieren.

Der bei der Eliminierung beschrittene Hauptweg führt zum Glukuronid der in beträchtlicher Menge auch frei ausgeschiedenen Substanz. Hydroxylierung und anschließende Glukuronidierung besitzen ebenfalls große Bedeutung.
Die Ausscheidung der Substanz als Benzoe- bzw. Phenylessigsäure kann dagegen aufgrund ihrer stärkeren Dosierungsabhängigkeit als Nebenweg angesehen werden, der dann beschritten wird, wenn das Angebot an PPTS genügend groß ist.
Ungeklärt ist das Schicksal des Phenylpropyl-Restes der PPTS. Auch hier kann nur eine radioaktive Markierung der Substanz Aufklärung bringen.

2.7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden tierexperimentelle Untersuchungen über die Kinetik einer neuen, die Blutgerinnung hemmenden Substanz durchgeführt. Sie wirkt nach oraler Applikation, die Wirkung setzt erst nach einer Latenzzeit von mehreren Stunden ein. Damit entspricht die Substanz wesentlichen Kriterien für orale, indirekte Antikoagulantien.
Die Kinetik der 3-(1-Phenylpropyl)-5-phenyltetronsäure, im folgenden PPTS abgekürzt, verläuft anders als bei Marcumar oder Warfarin beobachtet wurde. Blut- und Leberspiegel sind polyphasisch. PPTS-Konzentrationsmaxima und Minima erscheinen in beiden Kurven zu gleicher Zeit. Die PPTS-Konzentration in der Leber ist beträchtlich höher als im Blut. Eine zeitliche Korrelation zwischen Wirkung und maximaler Konzentration der Substanz am Wirkort scheint nicht zu bestehen. Die Ursache dieses Phänomens konnte nicht geklärt werden. Nach dem Abklingen der Wirkung zeigt sich noch eine hohe Substanzkonzentration in der Leber.
Die Resorption erfolgt vollständig und schnell. Nach der Verteilung wird die Substanz in der Leber und nicht im hierfür geeigneten Fettgewebe gespeichert. Sie passiert bei der Ratte nicht die Plazentabarriere.
Die Eliminierung erfolgt hauptsächlich renal. Die Substanz unterliegt einer intensiven Biotransformation. Sie wird frei, an Glukuronsäure gebunden und als hydroxyliertes Produkt, das

ebenfalls glukuronidiert werden kann, ausgeschieden. Im Harn liegt PPTS hauptsächlich als Glukuronid vor. Ein stark dosisabhängiger und deshalb als Nebenweg anzusehender Abbau führt über Phenylessigsäure zur Benzoesäure, die ebenfalls frei und als Glukuronid ausgeschieden werden kann.
Es ist nicht wahrscheinlich, daß einer der Metaboliten aktiv in die Blutgerinnung eingreift, denn im allgemeinen wird die Wirksamkeit einer Substanz durch Einführung einer Hydroxylgruppe eher herabgesetzt. Die intensive Biotransformation beeinflußt die Wirksamkeit der Substanz in gleicher Weise.

3. Experimenteller Teil

3.1. Quantifizierung

3.1.1. Versuchstiere

Das Tiermaterial bestand aus männlichen, zwischen 150 g und 180 g schweren Sprague-Dawley Albinoratten, die mit Altromin-Standarddiät und Wasser ad lib. gefüttert wurden. Bei der Untersuchung des embryonalen Gewebes wurden drei weibliche zwischen 155 g und 160 g schwere Albinoratten des gleichen Stammes verwendet.

3.1.1.1. Applikationsform

Die PPTS wurde im Achatmörser verrieben und anschliessend in einer 1 %igen Methylzelluloselösung suspendiert, die 1 % Tween 80 als Lösungsvermittler enthielt, die Suspension danach mittels Ultraschall homogenisiert.

3.1.1.2. Applikationsart

Die Applikation erfolgte oral unter Zuhilfenahme einer Schlundsonde. Die Tiere wurden 24 Stunden vor dem Versuch nüchtern gehalten.

3.1.2. Herstellung der Organextrakte

3.1.2.1. Blut

Das Blut der durch Dekapitieren getöteten Ratten wurde mittels eines Trichters in einem 10 ml Meßzylinder, der 3 ml einer 0,1 molaren Citratlösung enthielt, aufgefangen. Das Blutvolumen wurde notiert, die Blut-Citratlösung in ein Zentrifugenglas mit eingeschliffenem Stopfen überführt.
Der Meßzylinder wurde mit 10 ml Ringerlösung in kleinen Anteilen ausgespült, die Ringerlösung mit der Blut-Citrat-Lösung vereinigt. Nach Zusatz von 20 ml Chloroform wurde das Zentrifugenglas mit einem Glasstopfen verschlossen, 20 Minuten in einer Horizontalschüttelapparatur geschüttelt und anschließend mit 6000 U/min. 15 Minuten lang in einer Zentrifuge vom Typ Mikrofuge der Firma Heräus-Christ zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde in einen Jodzahlkolben überführt.
Nach insgesamt dreimaliger Extraktion wurden die vereinigten Chloroformauszüge mit dem halben Volumen Wasser gewaschen und mit wenig Natriumsulfat getrocknet.

3.1.2.2. Leber

Nach der Dekapitierung und dem Ausbluten der Tiere wurde die Leber herauspräpariert, gewogen und zur Perfusion mit 10 ml Physiolog. Kochsalzlösung behandelt, die anschließend verworfen wurde. Die Leber wurde zerkleinert und nach Zugabe von 5 ml Ringerlösung mit dem Ultra-Turrax der Firma JKA homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenglas mit Schliffstopfen überführt und wie oben angegeben mit

Chloroform extrahiert, die Extrakte in gleicher Weise gesammelt, gewaschen und getrocknet.
Extrakte aus Milz, Niere und Fett wurden nach diesem Verfahren hergestellt.

3.1.2.3. Embryo

Drei weiblichen Ratten wurden zwölf Tage nach der Befruchtung je 50 mg PPTS entsprechend 312 mg/kg Tier verabreicht.
32 Stunden nach Applikation der Substanz erfolgte die Dekapitierung der Tiere und die Präparation der Embryonen.
Das aus 1,35 g Embryonen gewonnene Homogenat wurde wie die vorhergehend beschriebenen Homogenate behandelt.

3.1.3. Gaschromatografie

Erprobung einer geeigneten Säule und Versuchsbedingungen.
Die Quantifizierung der in Blut und Leber vorhandenen aktuellen PPTS-Konzentration fand unter den folgenden Versuchsbedingungen statt:
Es wurde das Gerät F & M 810 benutzt.
Daten der verwendeten Glassäule: Länge 6 Fuß, Durchmesser 1/4"
Der Träger bestand aus Chromosorb 6-Aw von 80 - 100 Korngröße, die flüssige Phase aus SE 30, 10 %ige Belegung.
Trägergas: N_2 rein, Menge 30 ml/min, Vordruck 3 Atü
Temperatur 250°C, Empfindlichkeit 32, Bereich 10^2
Detektor FID 320°C, IP 250°C, Luft 350 ml/min. H_2 35 ml/min.

Schreiber: Firma Hewlett-Packard, Papiervorschub 0,25 inch/min. An den Schreiber war ein Computing Integrator der Fa. Perkin-Elmer vom Typ M - I angeschlossen, der die Meßwerte der Peakflächen angab.
Mit einer Verdünnungsreihe wurde die Nachweisgrenze für PPTS ermittelt. 3 µg PPTS ergaben einen noch gut auswertbaren Peak. Die Retentionszeit lag bei 30 Minuten.

Nach der Klärung dieser für die Quantifizierung erforderlichen Daten wurde ein Blindchromatogramm eines Aliquot Leberextrakt bzw. Blutextrakt ohne PPTS entnommen um festzustellen, ob der PPTS-Peak mit dem Peak einer physiologisch vorkommenden Substanz zusammenfallen würde. Es zeigte sich, daß nur methylierte Extrakte brauchbare Chromatogramme lieferten. Der PPTS-Peak erschien in einem Chromatogrammbereich, der die eindeutige Identifizierung der PPTS zuließ.

Der nächste Schritt bestand in der Ausarbeitung einer geeigneten Quantifizierungsmethode. Als Grundlage diente hierbei die Methode des Inneren Standard [28].
Substanz 7 (p-Chlor-phenylpropyl-phenyltetronsäure) wurde als innerer Standard benutzt. Die methylierte Substanz besaß eine um fünf Minuten längere Retentionszeit als die PPTS nach Methylierung, die Peaks beider Substanzen lagen genügend dicht beieinander.

Berechnung des bei dieser Methode erforderlichen Korrekturfaktors.
Etwa je ein Milligramm beider Substanzen wurden genau in ein 6 ml Reakti-Vial Gefäß gewogen, in wenig Methanol gelöst und mit Diazomethyn methyliert, mit N_2 abgeblasen, das Reaktionsgemisch mit 100 µl Methanol aufgenommen und 3 µl gespritzt. Acht verschiedene Proben wurden hergestellt, von jeder fünf bis sechs Chromatogramme angefertigt. Es erwies sich als vorteilhaft, die Konzentration der als innneren Standard benutzten Substanz nicht unter 3 µg/µl anzusetzen, weil sonst der Peak des inneren Standard nicht deutlich genug aufgezeichnet wurde.

$$\text{Korrekturfaktor Kf} = \frac{\text{Gramm ges. Subst.} \bullet \text{Meßwert Peak in. Stan.}}{\text{Gramm in. Stan.} \bullet \text{Meßwert Peak ges.Subst.}}$$

Ges. Substanz = gesuchte Substanz,
in. Standard = innerer Standard

Der Korrekturfaktor Kf wurde nach dieser Formel ermittelt.
Er betrug 0,3615.

3.1.3.1. Vorbereitung der Proben

Die Chloroformphase der Organ-Extrakte wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in genau 2 ml Methanol gelöst. Es wurde prinzipiell mit wenig Lösungsmittel gearbeitet, um möglichst konzentrierte Lösungen zu erhalten. Ein Milliliter der Lösung wurde in ein Reagensglas mit eingeschliffenem Stopfen

Oberführt, das Methanol am Rotationsverdampfer vorsichtig abgezogen. Anschließend wurden mindestens zwei Milligramm innerer Standard genau eingewogen, Rückstand und innerer Standard durch tropfenweise Zugabe von Methanol in Lösung gebracht und mit ätherischer Diazomethanlösung methyliert. Es wurde soviel Diazomethan zugegeben, bis die überstehende Diazomethanlösung ihre Gelbfärbung behielt. Die Ätherphase wurde nach Ende der Reaktion mit N_2 abgeblasen, der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen. Drei Mikroliter dieser Lösung wurden jeweils bei einem Lauf mit einer fünf Mikroliter SGE-Spritze auf die Säule gegeben.

3.1.3.2.

Berechnung der in den Proben enthaltenen PPTS-Menge.

Die in den Extrakten enthaltenen PPTS-Konzentrationen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Conc.ges.Subst.} = \frac{\text{Kf} \bullet \text{Fläche ges.Subst.} \bullet \text{Conc. in.Stan.}}{\text{Fläche in. Standard}}$$

Conc. ges. Substanz = Konzentration der gesuchten Substanz
Kf = Korrekturfaktor
Conc. in Standard = Konzentration innerer Standard
Fläche in.Standard = Fläche innerer Standard
Fläche ges.Substanz = Fläche der gesuchten Substanz

Willkürlich gewähltes Beispiel für die Berechnung der PPTS-Konzentration anhand des Leberextraktes 12, der zwölf Stunden nach Applikation der Substanz hergestellt wurde:

Korrekturfaktor Kf = 0,3615, eingewogene Menge innerer Standard = 2,35 mg, vom Integrator ausgedruckter Flächenwert für den Peak der PPTS = 210 507, Flächenwert des inneren Standard = 267 875

$$\text{Konzentration der PPTS} = \frac{0{,}3615 \cdot 210507 \cdot 2{,}35}{267875}$$

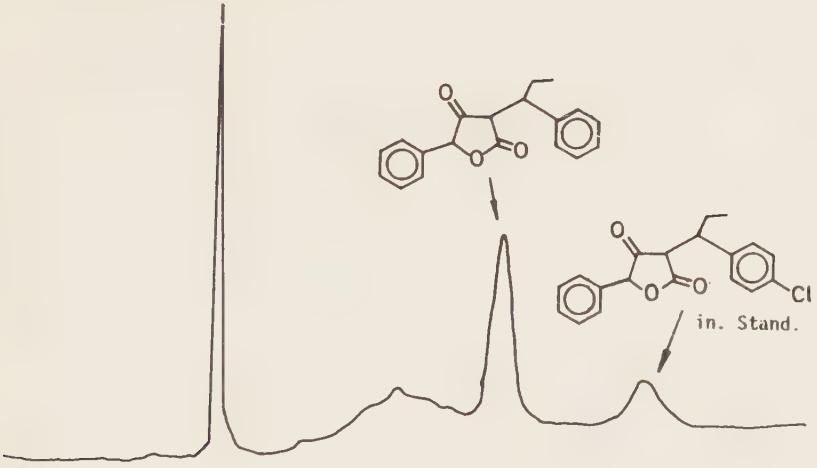
$$= 0{,}66 \text{ mg PPTS} / 3\mu\text{l}$$

$$= 0{,}22 \text{ mg PPTS} / \mu\text{l}$$

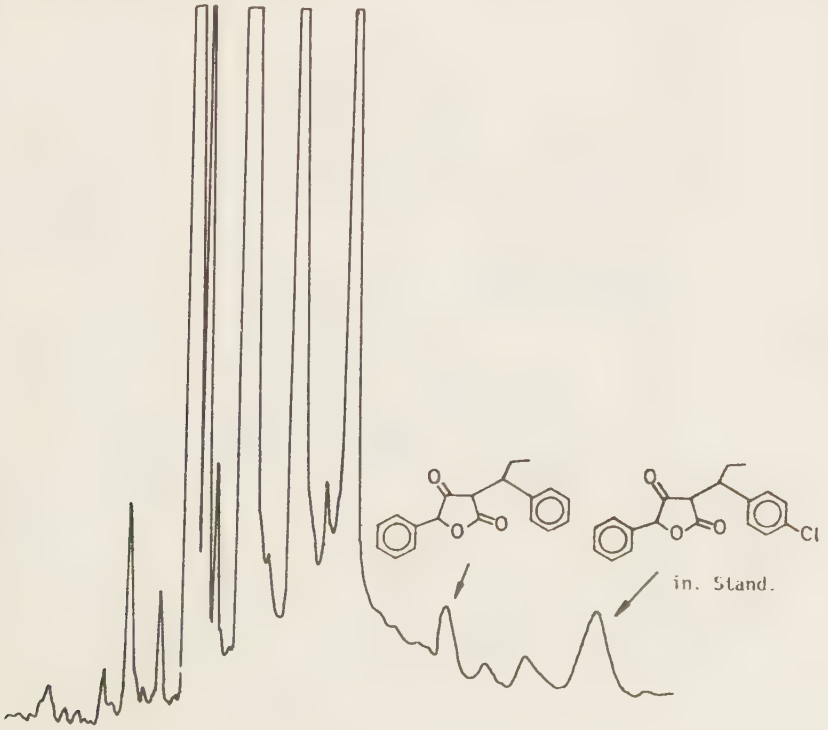
Ein Milliliter der methanolischen Ausgangslösung enthielt demnach II mg PPTS, denn ein Milliliter dieser Lösung wurde methyliert und in 50 Mikrolitern aufgenommen, die Lösung enthielt insgesamt 22 mg PPTS, die aus 8,53 g Leber extrahiert wurden. In einem Gramm Leber befand sich nach zwölf Stunden die Menge von 2,57 mg PPTS.

Von jedem Extrakt wurden fünf Chromatogramme angefertigt, wenn die Werte stark differierten, bis zu acht und daraus der Mittelwert errechnet. Vor dem Chromatografieren eines neuen Extraktes wurde ein methyliertes Gemisch bekannter Konzentration von PPTS und innerem Standard gespritzt, um die Retentionszeiten beider Substanzen zu überprüfen. Die Identität der gemessenen Peaks mit den zu quantifizierenden Substanzen wurde durch kombinierte Anwendung von Gaschromatografie und Massenspektrometrie nachgewiesen. Eine andere Möglichkeit bestand in der Zugabe der gesuchten Substanz. In diesem Falle mußte eine Flächenvergrößerung des fraglichen Peaks erfolgen.

Chromatogramm 1 . Abb. 25:



Chromatogramm 2 Abb. 26:



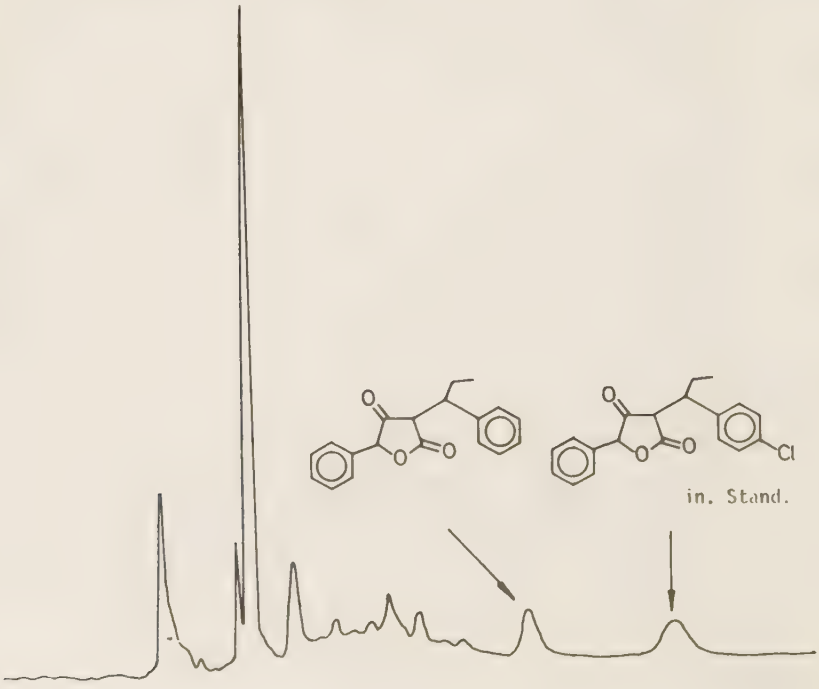
3.1.3.3.

Gaschromatogramme: Beispiele für

1) PPTS und innerer Standard
2) Leberextrakt
3) Blutextrakt

1) Probelösung, die 2 mg PPTS und 2,3 mg Substanz 7 als inneren Standard enthielt. (Abb. 25)
2) Der Leberextrakt wurde zu Testzwecken mit PPTS und innerem Standard versetzt. (Abb. 26)
3) Blutextrakt mit PPTS und innerem Standard.

Chromatogramm 3 Abb. 27:

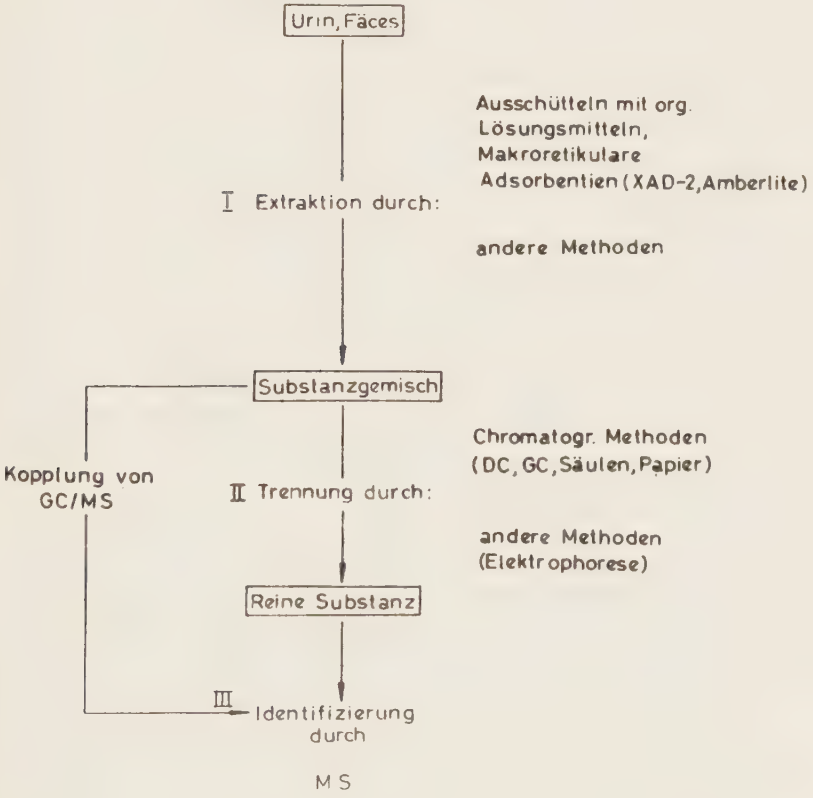


3.2.Isolierung und Strukturaufklärung der Metaboliten

3.2.1.Allgemeine Methodik

Biologisches Material

Abb. 28:



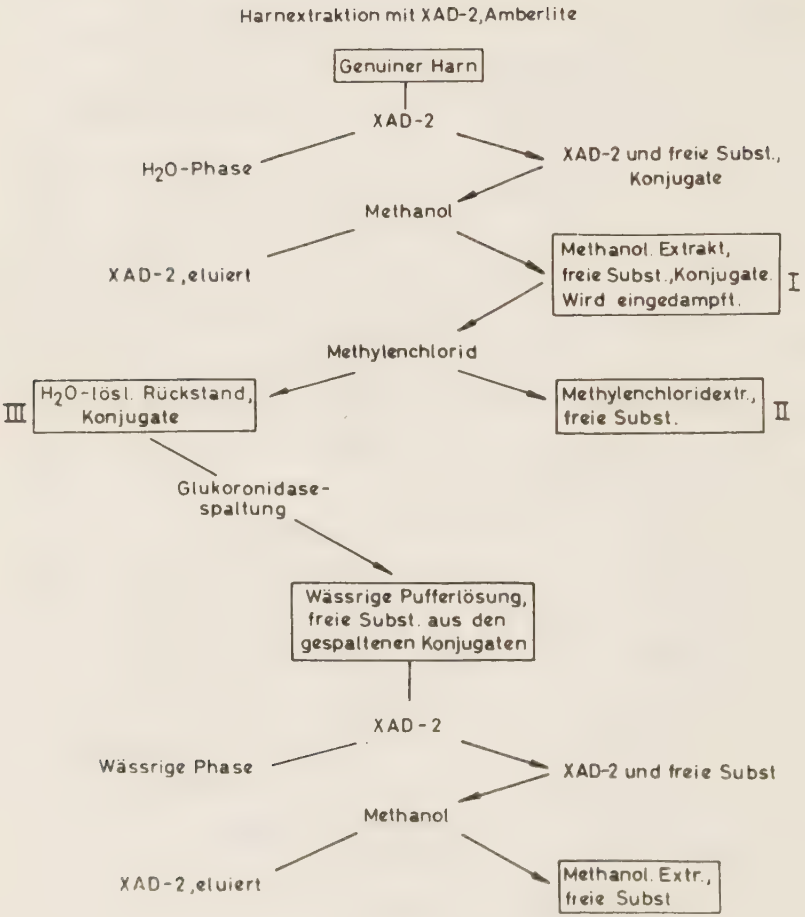
Der Weg, der zur Isolierung und Strukturaufklärung von Metaboliten führt, verläuft in drei Stufen (Abb. 28). Das biologische Material, das den mutmaßlichen Metaboliten enthält, wird extrahiert. Die Extraktion I kann auf unterschiedliche Art durchgeführt werden, so z.B. durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln, mit makroretikularen Adsorbentien vom Typ Amberlite XAD-2 oder in anderen Fällen über Ionenaustauscher. Am Ende dieser Prozedur steht in der Regel ein Gemisch von Substanzen, die von einander zu trennen sind. Die Trennung II in reine Substanzen kann unter Benutzung vorwiegend chromatografischer Methoden wie DC, GC, Säulenchromatografie und Papierchromatografie durchgeführt werden. Von anderen Methoden, die bei spezieller Problematik Anwendung finden, seien Elektrophorese und Gelfiltration erwähnt. Nachdem es gelungen ist, die gesuchte Substanz, von der man annimmt, daß es sich um einen Metaboliten handeln könnte, zu isolieren, erfolgt ihre Identifizierung III. Hierbei führt der Einsatz moderner analytischer Hilfsmittel, MS, NMR, IR und spektrofotometrischer Methoden zum Ziel. Leider läßt häufig die begrenzte Menge der zur Verfügung stehenden Substanz die Verwendung nur einer dieser Methoden zu. Am elegantesten ist die Kopplung von Gaschromatografie und Massenspektrometrie. Die Einführung von Kapillarsäulen brachte eine erhebliche Verbesserung der Trennleistung mit sich.

3.2.2. Extraktion von Urin und Faeces

Der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gingen Versuche über die Löslichkeit der PPTS in Methanol, Aceton, Äthanol, Chloroform, Methylenchlorid und Äther voraus. PPTS war in Methanol, Aceton und Äthanol sehr gut löslich, in Chloroform und Methylenchlorid löslich, in Äther weniger gut löslich. Der Begriff "Löslichkeit" bezieht sich nicht auf die im DAB 7 gegebene Definition. Bei dem Versuch, die PPTS mit Lösungsmitteln, die nicht mit Wasser mischbar waren, aus wässrigem Medium auszuschütteln, ließen sich die Phasen schlecht trennen. Eine bessere und sehr sohonende Methode stellt die Extraktion des Urin mit Amberlite XAD-2 dar. Außerdem werden mit XAD-2 weder Salze noch Harnstoff adsorbiert [29] [30].

In einem Vorversuch wurde die Kapazität des XAD-2 für PPTS getestet. Dazu wurden 125 g XAD-2 mehrfach mit Aqua dem. gewaschen, in ein Becherglas gegeben und mit einer Suspension von 6 mg PPTS in Wasser versetzt. Die 6 mg PPTS wurden um eine bessere Verteilung zu erreichen, in 3 ml Methanol gelöst und die Lösung in 250 ml Wasser suspendiert. Das Gemisch wurde vier Stunden bei Zimmertemperatur mit einem Magnetrührer gerührt, das Wasser über einer Trichterfritte abgezogen, zweimal in kleinen Anteilen mit je 250 ml Wasser nachgewaschen und anschließend portionsweise mit 250 ml Methanol eluiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand getrocknet. Die Ausbeute betrug 5,3 mg entsprechend 88,3 % und war zufriedenstellend.

Abb. 29:


Harnextraktion mit XAD-2,Amberlite
Genuiner Harn
XAD-2
H2O-Phase
XAD-2 und freie Subst., Konjugate
Methanol
XAD-2,eluiert
Methanol. Extrakt, freie Subst.,Konjugate. Wird eingedampft.
I
Methylenchlorid
III
H2O-lösl. Rückstand, Konjugate
Methylenchloridextr., freie Subst.
II
Glukoronidase-spaltung
Wässrige Pufferlösung, freie Subst. aus den gespaltenen Konjugaten
XAD-2
Wässrige Phase
XAD-2 und freie Subst
Methanol
XAD-2,eluiert
Methanol. Extr., freie Subst

3.2.2.1.

Schema der Harnextraktion mit Amberlite XAD-2

Fünf 160 g - 180 g schwere Ratten wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten, Harn und Faeces über 72 Stunden gesammelt. Die Dosierung der PPTS wurde bei den einzelnen Versuchen variiert. Sie reichte von etwa 416 mg/kg Ratte bis zu 220 mg/kg Ratte. Die ausgeschiedene Menge Harn betrug im Durchschnitt 10 ml in 24 Stunden pro Tier. Im selben Zeitraum wurden pro Tier etwa 8 g Faeces ausgeschieden.

Der Harn wird mit dem gut mit Aqua dem.,Methanol und wieder Aqua dem. gewaschenen Kunstharzadsorbens im Verhältnis 2 : 1 versetzt und im Becherglas vier Stunden gerührt.
Über einer Trichterfritte wird die wässrige Phase abgezogen und im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wird das XAD-2 mehrmals mit Wasser gewaschen und sodann mit Methanol eluiert. Die Elution kann auch mit einem Aceton/Wasser-Gemisch vorgenommen werden, die Zusammensetzung ist hierbei von den Eigenschaften der zu erwartenden Metaboliten abhängig. In diesem Fall reichte Methanol als Elutionsmittel aus. Der methanolische Extrakt wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und der Rückstand I so lange mit Methylenchlorid extrahiert, bis sich im letzten Methylenchloridauszug keine PPTS mehr nachweisen ließ. Die Methylenchloridauszüge wurden gesammelt, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand II in Methanol aufgenommen. Der aus Rückstand I durch Extraktion mit CH_2Cl_2 erhaltene Rückstand III wurde zur fermentativen Spaltung mit Glukuronidase bereitgestellt. (Abb. 29)

Er enthielt die in Methanol aber nicht in Methylenchlorid löslichen Substanzen wie die gut wasserlöslichen Glukuronide und Sulfate. Die freien Substanzen befanden sich dagegen im Methylenchloridextrakt, aus dessen Gemisch sich mit präparativen Methoden die jeweiligen Metaboliten isolieren lassen.

3.2.2.2. Enzymatische Spaltung von Konjugaten

Der zur Glukuronidasespaltung bereit gestellte Rückstand wurde mit 0,2 normalem Na-Azetatpuffer aufgenommen. Das Volumen der Pufferlösung entsprach der ursprünglichen Harnmenge. Nach Zusatz von 500 E/ml β-Glukuronidase und 0,4 g Toluol p.a. aus Rinderlunge, Fa. Schering [31] wurde 24 Stunden bei 37°C. inkubiert. Danach wurden erneut 500 E/ml β-Glukuronidase zugesetzt und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird nach 48 Stunden durch Zugabe von gleichen Volumen Äther/Chloroform 3 : 1 beendet, die wässrige Lösung insgesamt dreimal mit dem Lösungsmittelgemisch extrahiert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und in Methanol aufgenommen. Auch hier besteht die Möglichkeit, statt eines organischen Lösungsmittelgemisches mit XAD-2 zu arbeiten, um die mitunter problematische Phasenvermischung zu vermeiden. Nach der gleichen Vorschrift wird die am Anfang bei der Extraktion des Harnes mit Amberlite erhaltene wässrige Phase behandelt um sicher zu gehen, daß auch die Konjugate möglichst quantitativ extrahiert wurden. Die wässrige Harnphase wird nach der Extraktion mit Amberlite auf einen pH-Wert von 4,62 eingestellt und in der beschriebenen Weise mit Glukuronidase gespalten.

Der methanolische Extrakt der Glukuronidasespaltung kann nun zur Isolierung von Metaboliten herangezogen werden. In derselben Art wurden vor Applikation der PPTS Vergleichsextrakte ohne PPTS hergestellt.

3.2.2.3. Herstellung von Faecesextrakt

Faeces von fünf in der angegebenen Dosierung mit PPTS gefütterten Tieren wurden über drei Tage gesammelt und davon 40 g im Mörser zerkleinert und im Soxhlet fünf Stunden mit 100 ml Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt, der Rückstand mit Methylenchlorid extrahiert, das restliche Methylenchlorid mit N_2 entfernt. Anschließend erfolgte eine Glukuronidasespaltung. Von den Methylenchloridauszügen wurde das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in vier ml Methanol aufgenommen. Auch hier ging der eigentlichen Extraktion die Herstellung von Blindextrakten voraus. Sie erfolgte analog den schon beschriebenen Arbeitsmethoden.

3.2.3. Trennung des Substanzgemisches

Isolierung der Metaboliten

Die nachstehenden Arbeitsmethoden standen zur Verfügung und wurden auf ihre Anwendbarkeit geprüft:

1) Präparative Dickschicht
2) Präparative Dünnschicht
3) Papierchromatografie
4) Säulenschromatografie
5) Multiplikative Verteilung nach CRAIG

3.2.3.1. Präparative Dünnschicht

Die besten Ergebnisse ließen sich bei der Lösung der in diesem speziellen Fall vorliegenden Probleme mit der präparativen Dünnschicht erreichen. Voraussetzung hierfür war die Wahl eines geeigneten Fließmittels.
Die Mischung im Verhältnis:

Chloroform	:	Aceton	:	Benzol	:	Äthanol	:	NH_3
1	:	1	:	2	:	2	:	0,5

besaß von 53 zusammengestellten Fließmitteln die beste Trenneigenschaft. Das Plattenmaterial bestand aus Fertigplatten der Firma Merck, Schichtdicke 0,2 mm mit und ohne Fluoreszenszindikator (KG-Merck 254) und selbst hergestellten Platten. Vorbehandlung der Fertigplatten: Die Platten wurden vor dem Benutzen dreimal mit Methanol spectrograde gewaschen.

Nach jedem Waschen wurden sie im Trockenschrank bei 100°C 20 Minuten reaktiviert. Die im Kieselgel als Weichmacher enthaltenen Phthalsäureester wurden weitgehend aus der Sorptionsschicht entfernt und an den oberen Plattenrand geschwemmt. Dieser Bereich der Kieselgelschicht wurde abgetrennt und verworfen. Die Extrakte wurden bandenförmig mit der Hand aufgetragen. Hierfür wurde eine Glaskapillare mit ausgezogener und gebogener Spitze benutzt, die an einer Schablone entlang geführt wurde. Die Spitze der Kapillare berührt die Schichtoberfläche nur leicht, ohne sie zu verletzen. Dieses Verfahren hat gegenüber der Auftragetechnik mit dem Autoliner den Vorteil, daß kleine Extraktmengen ohne großen apparativen Aufwand schnell aufgetragen werden können und Zwischenfälle, wie sie bei Verstopfen der Autoliner-Düsen leicht auftreten, vermieden werden.

Die Chromatogramme wurden in mit Fließpapier ausgekleideten Kammern entwickelt, die Sättigung der Kammern durch Umschütteln erreicht. Nach Entwicklung der Chromatogramme, wobei der obere Rand der Sorptionsschicht die Grenze der Fließhöhe darstellte, wurde die Schicht zwischen den einzelnen Banden unterbrochen, die Platte um 90°C gedreht und in Methanol spectrograde erneut entwickelt. Damit wurde eine Anreicherung der Substanz bewirkt.

Anschließend wurde das den Substanzfleck enthaltende Kieselgel von der Platte entfernt und in einer Mikrofritte D 3 mit reichlich Methanol spectrograde extrahiert. Der methanolische Extrakt wurde am Rotationsverdampfer vorsichtig eingeengt und zur erneuten Reinigung auf einer wie beschrieben vorbereiteten DC-Platte in gleicher Weise chromatografiert.
Die Sorptionsschicht um den Fleck wurde beseitigt und die Substanz unter Zuhilfenahme einer Kapillare mit Methanol vorsichtig an den Rand des Fleckes gespült. Hier fand eine erneute Konzentration der Substanz statt. Das Verhältnis gesuchte Substanz: Trägerschicht wird so bedeutend verbessert. Das den Fleck enthaltende Kieselgel wurde von der Platte abgenommen und in der Mikrofritte mit wenig Methylenchlorid eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter N_2 vertrieben und der Rückstand mit einigen Tropfen Methanol aufgenommen und auf eine selbst hergestellte Platte übertragen. Die Trägerschicht dieser Platte bestand aus Kieselgel-A-2 TLC p.a. der Firma Serva. Die Platten wurden nach folgendem Verfahren hergestellt: 20 g Kieselgel und 5 g Leuchtstoff "grün" der Firma Wolm wurden in 25 ml eines Gemisches von Methanol p.a. und aqua dem. 1 : 1 homogen verrührt und der Kieselgelbrei mit einem Desaga-Streichgerät auf Glasplatten im Format 20 cm • 20 cm gebracht. Die Platten wurden ebenfalls im Trockenschrank aktiviert und anschließend mit Methanol spectrograde gewaschen. Hierbei war große Vorsicht geboten, weil die Trägerschicht schlecht auf dem Untergrund haftete. Diese Platte enthielt die saubere, für die Identifizierung durch das MS brauchbare Substanz.

Das mit der Substanz angereicherte Kieselgel wurde in gewohnter Weise mit wenigen Tropfen Methylenchlorid eluiert, das Eluat in einem Glührörchen aufgefangen, das Methylenchlorid mit N_2 vertrieben, die verschlossene Probe zur massenspektrometrischen Identifizierung gegeben.

3.2.3.2. Transfertechnik

Eine Abwandlung der Extraktionsmethode sollte das Mitschleppen von Sorptionsschichtpartikeln verhindern. Hierbei entfiel das Chromatografieren auf selbstgefertigten Platten. Die Substanzen wurden bis zu einem möglichst großen Reinigungsgrad auf Fertigplatten aufgetragen, chromatografiert und die Trägerschicht um den Substanzfleck entfernt. Anschließend wurde ein Streifen Chromatografiepapier, der dieselbe Breite und die dreifache Länge des Fleckes besaß und am vorderen Ende in einer Spitze auslief, auf den Fleck gelegt. Das hintere Ende des Papierstreifens überragte den Fleck um einige Millimeter. Das Papier wurde mit einer Glasplatte, die nicht breiter als der Fleck lang war, festgehalten. Die Papierspitze wurde von der Platte weg nach oben gebogen. Durch vorsichtige Zugabe von Methylenchlorid, das mit einer Kapillare auf das hintere überstehende Ende des Papierstreifens getropft wurde, wanderte die Substanz in die Spitze des Papierstreifens und reicherte sich dort an. Die Spitze des Papierstreifens wurde abgeschnitten und in einer Mikrofritte mit Methylenchlorid extrahiert. Auch dieses Vorgehen lieferte brauchbare Ergebnisse. Der Versuch, die Substanz mit dem Papier als Träger in einem Direkt-Transfer in das

MS-Gerät zu überführen, war nicht erfolgreich, weil in den Spektren der Untergrund zu stark hervortrat.
Die vorgestellte Technik wurde eigenständig entwickelt.

3.2.4. Strukturaufklärung durch Massenspektrometrie

Der Substanzbedarf zur Herstellung von NMR- und IR-Spektren war größer als die Menge der in reiner Form isolierten Metaboliten. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte daher mit Hilfe der Massenspektrometrie. Die Massenspektren wurden im Massenspektrometer CH 7 VARIAN Mat aufgenommen, die Ionisationsspannung betrug 70 eV. Die Identität der Metaboliten wurde durch Vergleich der MS-Spektren von Referenzsubstanzen ermittelt.

4. LITERATURVERZEICHNIS

1. K.P. Link et al., J. Biol. Chem. 153, 5 (1944)

2. E. Renk, W.G. Stoll, Fortschritte der Arzneimittelforschung, Bd. II, S. 153 ff, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1968)

3. J. Wagenknecht, Dissertation, Freie Universität Berlin (1976)

4. Martius, Angew. Chemie 73, 597 (1961)

5. R.E. Olson, Science 145, 926 (1964)

6. W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftsverlag, Biograph. Institut

7. K. Seiler, F. Duckert, Thromb. Diath. Häm. 19, Nr. 3/4, 389-96 (1968)

8. Weiner, M., S. Shapiro, J. Acelrod, J.R. Cooper and B.B. Brodie J. Pharmakol. Exp. Ther. 99, 409-420 (1950)

9. O'Reilly, R.A., P.M. Aggeler, Thromb. Diath. Häm. (Stuttg.) 8, 82 (1962)

10. J. Koch-Weser, E.M. Sellers, New Eng. J. Med. 285, 10, (1971)

11. C. Blatrix, S. Charonnat, J.P. Tillerment, J. Israel, J. P. Brevet, J. Debraux, M. Merlin, Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol. XIII, 984-995 (1968)

12. Booth, A.N. et al., J. Biol. Chem. 234, 946 (1959)

13. Kaighen, M., and Williams, R.T.: J. Med. Pharm. Chem. 3, 25 (1961)

14. Kerekjarto, B.V.: Zeitschr. Physiol. Chem. 345, 264 (1966)

15) G. Feuer, Metabolism and biological actions of coumarins,
Prog. Med. Chem.(1974) 10, 85-158

16) P.A. Gibbs, K. Janakidevi and G. Feuer:
Canad. J. of Biochem., Vol. 49 (1971)

17) C. Van Sumere and H. Teuchy, Arch. Int. de Physiol. et de Biochim.
(1971), 79, 665-679

18) O'Reilly, R., A., P.M. Aggeler und L.S. Leong,
Thromb. Diath. haemorrh. II, I (1964)

19) R.A. O'Reilly, P.M. Aggeler, M.S. Hoag und L. Leong,
Thromb. Diath. haemorrh. 8, 82 (1962)

20) R. O'Reilly, P.M. Aggeler und L.S. Leong,
J. Clin. Invest 42, 1542 (1963)

21) J. Burns, M. Weiner, G. Simson und B.B. Brodie,
J. Pharmac. exp. Ther. 108, 33 (1953)

22) J.J. Burns, W. Wexler und B.B. Brodie, J. Am. Chem. Soc. 75,
2345 (1953)

23) F. Christensen, Biochem. Pharmacol., Vol. 21,
2303-2311, Pergamon Press (1972)

24) K. Biemann, Mass Spectrometry, Organic Chemical Application
Verlag McGraw-Hill, Book Co. Inc. New York(1962)

25) Krishnaswami et al., Indian J. Exp. Biol. (1971) 9(4), 458-61

26) Murray, C.W., A.N. Booth, F. De Eds and F.T. Jones,
Absorption and Metabolism of Rutin and Querutin in the Rablit,
J.Amer.Pharmaceut. Assoc., Sci. Ed. 43, 361 (1954)

27) Scheline, R.R., Acta Pharmacol. Toxicol. 26, 325-331 (1968)

28) Kaiser, R., Chromatografie in der Gasphase, Bd. 4,
Hochschultaschenbucher B.I.

29) Bradlow, H.L., Extraction of Steroid Conjugates with a Neutral Resin,
Steroids, Vol. II, p 265 (1968)

30) M.L. Bastos et al, J. Chromatogr. 71 (1972) 549-553

31) F. Stall, G. Dörner, Endokrinologie 59, 407-10 (1972)

LEBENSLAUF

13. März 1940	geboren in Berlin - Altglienicke
Eltern	Alfred Schinke, Margarete Schinke geb. Hoffmann
1946 - 1953	Grundschule in Berlin - Altglienicke
1953 - 1960	Französisches Gymnasium
März 1960	Reifeprüfung am Französischem Gymnasium
SS 1960 - WS 1964	Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin
1964 - 1966	Pharmazeutisches Praktikum in der Harzer Apotheke in Berlin
März 1966	Pharmazeutische Vorprüfung in Berlin
Feb. 1967	Heirat mit der Apothekerin Beate Rudolph
WS 1967 - SS 1970	Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin
20. Okt. 1970	Pharmazeutische Prüfung in Berlin
April 1971 - Sep. 1976	Beginn der vorliegenden Dissertation am Fachbereich Pharmazie der Freien Universität Berlin, Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Freien Universität Berlin

Druck: Verlag Die Arbeitswelt GmbH, Körtestr. 10, Berlin 61
☎ 691 65 36